

Aus der II. Inneren Abteilung des
Städtischen Krankenhauses Berlin Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. I. Boll

**Wirkungen von CML— und Leukopenie-Seren
sowie Pokeweed-Mitogen-Überstand
auf das Wachstum von Knochenmarkzellen
bei chronisch-myeloischer Leukämie,
untersucht mit der Suspensionskulturmethode
über einen Zeitraum bis zu 16 Tagen**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günther Möllmann
aus Bayreuth

1983



Aus der II. Inneren Abteilung des
Städtischen Krankenhauses Berlin Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. I. Boll

Wirkungen von CML- und Leukopenie-Seren
sowie Pokeweed-Mitogen-Überstand
auf das Wachstum von Knochenmarkzellen
bei chronisch-myeloischer Leukämie,
untersucht mit der Suspensionskulturmethode
über einen Zeitraum bis zu 16 Tagen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günther Möllmann
aus Bayreuth

Referent: Prof. Dr. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. H. Gerhartz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 16.3.1983

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	
1.1. Einleitung	1
1.2. Fragestellung	8
2. <u>Methode und Material</u>	
2.1. Methode	9
2.1.1. Kulturansatz (Suspensionskultur)	9
2.1.2. FICOLL-Separation	10
2.1.3. Auswertung: Reifungskurven	10
Mitose-Index	11
Granulopoetischer Reifungsindex	11
Zellmorphologie	11
2.1.4. Statistik	12
2.2. Material	
2.2.1. Knochenmarkzellspender: Pat. A.M. (I)	13
Pat. A.G. (II)	14
Pat. B.-H. K. (III)	15
Pat. E.Z. (IV)	16
2.2.2. Spender des Leukopenieserums	17
2.2.3. Zusätze	
2.2.3.1. RPMI 1640	18
2.2.3.2. Pokeweed-Mitogen-Überstand	18
2.2.3.3. CML-Eigensserum: frisch	
gefroren	18
2.2.3.4. CML-Fremdserum: gefroren	18
2.2.3.5. Leukopenie-Serum	18
2.3. Übersicht der Ansätze (Tabelle 1)	19
3. <u>Ergebnisse</u>	
3.1. Kulturreihe I	20
3.1.1. Ansatz Nr. 1	
3.1.2. Ansatz Nr. 2	
3.1.3. Ansatz Nr. 3	
3.1.4. Ansatz Nr. 4	

	Seite
Abbildung 1 - 9 der Kulturreihe I	22-29
3.2. Kulturreihe II	30
3.2.1. Ansatz Nr. 5	
3.2.2. Ansatz Nr. 6	
3.2.3. Ansatz Nr. 7	
3.2.4. Ansatz Nr. 8	
Abbildung 10 - 18 der Kulturreihe II	32-36
3.3. Kulturreihe III	37
3.3.1. Ansatz Nr. 9	
3.3.2. Ansatz Nr. 10	
3.3.3. Ansatz Nr. 11	
3.3.4. Ansatz Nr. 12	
3.3.5. Ansatz Nr. 13	
Abbildung 19 - 29 der Kulturreihe III	39-45
3.4. Kulturreihe IV	46
3.4.1. Ansatz Nr. 14	
3.4.2. Ansatz Nr. 15	
3.4.3. Ansatz Nr. 16	
Abbildung 30 - 36 der Kulturreihe IV	48-52
3.5. Die weißen Mitose-Indices (Tabelle 2)	53
3.5.1. Vergleich der wMI nach Zusatz von frischem und gefrorenem CML-Eigenserum Signifikanzberechnung (Tabelle 3 u. 4)	55
3.5.2. Mittelwerte der weißen Mitose-Indices ($\overline{wMI}$) (Tabelle 5; Abbildung 37)	57
3.5.3. Vergleich der Mittelwerte der wMI (Tab. 6)	59
3.6. Der modifizierte Reifungsindex (Tabelle 7 u. 8; Abbildung 38 - 41)	60
3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse	64
4. <u>Diskussion</u>	67
5. <u>Zusammenfassung</u>	80
6. Literaturverzeichnis	81

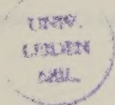
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1. Einleitung

Veränderungen im peripheren Blutbild sind nicht nur Ausdruck der veränderten Abgabe von Blutkörperchen aus dem Knochenmark an die Blutbahn, sondern auch von einem gestörten Gleichgewicht der Blutbildung. Diese Störungen könnten gut in kybernetischen Modellen der Blutbildung beschrieben werden, wenn alle Stellglieder und Ketten dieser Modelle bekannt wären.

Durch die Entwicklung der Suspensionskulturmethode zur Knochenmarkzellzüchtung wurde in der Synopsis mit anderen Methoden (Agar-Kultur-Technik, Koagulum-Kulturen in flüssigem Medium; Autoradiographie zur Bestimmung der DNA- und RNA-Syntheseleistung; Chromosomen-Analysen von Knochenmarkzellen; kinematographische Lebendbeobachtung u.a.) ein weiterer Schritt zur Aufhellung der pathogenetischen Mechanismen von Blutbildungsstörungen, wie z.B. der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) getan. Diese Methode ermöglichte es außerdem, durch Untersuchungen der Proliferation und Differenzierung von Knochenmarkzellen die Wirkungsweise eines oder mehrerer humoraler Regulationsmechanismen zu erhellen.

Die Zellzüchtungen mit dem in-vitro System der Agar-Kultur-Technik (Bradley/Metcalf 1966) erbrachten den Hinweis auf einen diffusiblen Faktor der Granulopoese. Bei dem Colonie-Stimulierenden-Faktor (CSF) handelt es sich nach Metcalf und Moore (44, 50) um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45.000. In anderen Untersuchungen (Übersicht bei Boll und Skoblo; 9 und 69) werden weitere positive "feed-back-transmitter" beschrieben, wobei jedoch wahrscheinlich nur CSF einen entscheidenden Einfluß auf das Stammzellkompartiment hat. Stryckmans (71) bezeichnet dieses Stammzellkompartiment als CFU-C. Es umfaßt 1 - 10 % der kernhaltigen Knochenmarkzellen, die bereits zur Granulo- bzw. zur Monopoese determiniert und außer den



Myeloblasten morphologisch nicht zu erfassen sind. Zellen dieses Kompartiments sind auch im peripheren Blut nachweisbar. Nach Moore (1974; 52) wird das CSF hauptsächlich in Makrophagen und Monozyten gebildet, während Robinson und Mangalik (1972; 64) annehmen, daß CSF von alternden Segmentkernigen sezerniert wird, und zwar durch Lysosomenzerfall. Pedersen (59) kommt zu dem Schluß, daß CSF über einen positiven "feed-back" Mechanismus bei hohen Konzentrationen die Granulopoese und bei niedrigen die Monopoese stimuliert.

Neben diesem positiven feed-back Mechanismus existiert auch ein negativer (zuerst beschrieben bei Rytömaa 1967). Ein Chalon, das wahrscheinlich von Granulozyten gebildet wird, soll kurzfristig, schnell und reversibel die Mitoseaktivität der Granulopoese senken, indem es die G-Phase im Zellzyklus der Granuloblasten verlängert.

CML, eine erworbene Systemerkrankung, ist weniger maligne, führt jedoch oft zum Tode des Patienten. Gründe dafür sind vor allem die schlechte therapeutische Beeinflußbarkeit durch die Ubiquität der Knochenmark- und Blutzellen und die bei einem bestimmten Prozentsatz der Erkrankten auftretende maligne Transformation (Pedersen; 59). Der Übergang in eine Osteomyelosklerose (OMS) ist möglich.

Früher galt die Annahme, daß die Zellen der CML primär leukämisch, d.h. autonom proliferierend seien, während man heute das Krankheitsbild als Störung des Regulationsmechanismus bei einem veränderten Zellclon der Pluripotenten Hämatopoetischen Stammzelle (PHSC) zu erklären versucht. Für diese Auffassung spricht unter anderem, daß bei den meisten Patienten mit CML eine erworbene Chromosomenanomalie (Philadelphia-Chromosom mit primärer Translokation von einem G-Chromosom 21 oder 22 auf Chromosom 9) der blutbildenden Zellen vorliegt.

Diese Translokation betrifft nicht nur die Granulopoese, sondern auch die Erythro-, Mono- und Megakaryopoese. Aus diesem Grunde geht Pedersen davon aus, daß alle Ph-1 positiven Knochenmarkzellen von einem aus einer pluripotenten

Stammzelle sich ableitenden monoclonalen Zellstrang abstammen. Bei der CML müssen allerdings auch normale (Ph-1-negative) Stammzellen vorhanden sein, dieses beweisen Chromosomenanalysen nach Remission.

Auswirkungen der genetischen Veränderungen in der PHSC betreffen jedoch vorwiegend die Granulopoese, wodurch deutlich wird, daß auch Regulationsstörungen eine wichtige pathogenetische Rolle spielen.

Wenn im Verlaufe der Erkrankung zusätzliche Chromosomenanomalien auftreten (22) in Zellen, die dadurch weiter reifungsgestört werden, dabei aber gleichzeitig einen Proliferationsvorteil erwerben, läßt sich das regulative Ungleichgewicht der Granulopoese bei CML bis zum Blastenschub nachvollziehen.

Moore stellte 1976 fest, daß bei unbehandelter CML das granulopoetische Stammzellkompartiment (CFU-C) im Knochenmark 15-fach und in der Peripherie sogar bis zu 500-fach vergrößert ist. Diese Vermehrung von CFU-C stimmt in der Relation nicht mit der nur 5- bis 20-fach erhöhten Granulozytenbildung überein. In dieser unangemessenen Mehrproduktion der granulopoetisch determinierten Stammzellen aus der pluripotenten Stammzelle sieht Moore eine der Regulationsstörungen. Bei CML kommt es im Gegensatz zur akuten myeloischen Leukämie (AML) in den Kulturanisätzen - wenn auch verzögert - zu einer Reifung der Myeloblasten; es entstehen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen (Olofsson und Olsson 1974, Moore 1976), die ebenfalls Ph-1-Chromosom positiv sind.

Neben den oben beschriebenen quantitativen Veränderungen des Stammzellkompartiments zeigen sich bei CML auch qualitative Besonderheiten. Moore (50) konnte durch Zentrifugieren in Rinder-Serum-Albumin mit einer Dichte von $1,062 \text{ g/cm}^3$ eine Abtrennung der leukämisch determinierten Stammzellen von normalen herbeiführen, da die leukämisch determinierten Stammzellen eine geringere Dichte haben. Die abnormal niedrige Dichte von leukämischen CFU-C bleibt auch bei

Patienten, deren Werte im peripheren Blut sich nach einer Chemotherapie normalisiert haben (Moore, Williams, Metcalf; 51). Die Autoren fanden auch morphologische Unterschiede zwischen diesen beiden Zellarten; die leukämisch determinierten Blasten ähnelten Myeloblasten, während die normalen Lymphozyten glichen (51). Aus der starken Koloniebildung der leukämisch determinierten Stammzellen schloß Moore, daß ihre Nachfolger Stammzeleigenschaften beibehalten, während normale Zellen diese Eigenschaften im Zuge der Reifung verlieren. Deswegen wird als der die CML verursachende Defekt eine onko-fetale Transformation angenommen. Dafür spricht, daß in der fetalen menschlichen Leber zwischen der 9. und 14. Schwangerschaftswoche Colonie-bildende Zellen (CFU-C) mit der gleichen Dichte wie bei CML gefunden wurden. Onko-fetale Transformation würde bedeuten, daß die CML-Stammzelle fetale Eigenschaften annimmt, aber auf Regulationsmechanismen in einem erwachsenen Organismus reagieren müßte. Diese Stammzelle würde viele Zellen mit hoher Proliferationsbereitschaft und schlechter Ausreifungstendenz (fetale Eigenschaften) hervorbringen, worauf die Regulationsmechanismen des erwachsenen Organismus mit einer Stimulation antworten müßten, was zu einem Proliferationsvorteil gegenüber normalen Zellen führt (Moore 1974; 52).

Eine Reihe von Untersuchungen gehen auf einen Regulationsdefekt als pathogenetischen Faktor der CML ein (13,17,27,50, 51,53,56,59,67,71). Moore (50) fand bei Patienten mit CML deutlich erhöhte Serum- und Urinwerte von CSF, obgleich der einzelne periphere Leukozyt bei CML normale Mengen von CSF produziert. CSF selbst soll bei dieser Erkrankung keine veränderte Qualität aufweisen (Metcalf 1974).

Die Frage, ob die vermehrte CSF-Produktion Ausdruck der Manifestation des neoplastischen Charakters ist oder als der ätiologische Faktor interpretiert werden kann, wird nicht geklärt, jedoch weist Golde (27) auf die Wirksamkeit eines

Regulationssysteme auch bei CML und einen möglichen Fehler in diesem System hin.

Olofsson (56) versucht, die Expansion des granulopoetisch determinierten Stammzellkompartiments in der chronischen Phase der CML durch die hohe CSF-Konzentration bei erhöhter Leukozytenzahl und defektem negativen "feed-back" Regulationsmechanismus zu erklären.

Stryckmans und Debuscher (71) dagegen gehen von einem auch bei CML funktionsfähigen negativen "feed-back"-Mechanismus aus. Die trotzdem vorhandene Vermehrung der myeloischen Zellmasse kann nach Meinung der Autoren auf eine geringere Empfindlichkeit der Zielzellen, einen erhöhten Level der noch funktionierenden Regulation oder eine Überschreitung der Kapazität des Systems durch Zellüberproduktion zurückzuführen sein.

Craddock (20) vermutet, daß die Unterdrückung der normalen Granulopoese bei akuter myeloischer Leukämie durch die Bindung von CSF an leukämische Blasten verursacht ist. Auch bei CML kann eine höhere Affinität von CSF zu pathologischen Stammzellen einen relativen Stimulatorenmangel für die normale Granulopoese bedeuten. Das wäre eine weitere Erklärung für den Wachstumsvorteil des pathologischen CFU-C (Pedersen; 59).

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Vorstellungen verschiedener Autoren, die von einer unangemessenen Mehrproduktion der Stammzellen bei CML ausgehen, stehen Überlegungen, die CML hauptsächlich als eine Störung der Ausreifung zu betrachten.

Trotz erhöhter Leukozytenzahl im Blut und Knochenmark bei CML ist die Regeneration, z.B. gemessen am Mitose-Index, vermindert (Boll 7,13,17), und zwar von 13 % bei der normalen Granulopoese auf 11,9 % bei der CML. Dieser Unterschied wird bei den Myeloblasten besonders deutlich, der Mitose-Index sinkt von 40 % auf 13 % bei CML ab (7).

Der ^3H -Thymidin-Markierungsindex als Ausdruck der Syntheseleistungen ist ebenfalls herabgesetzt (55).

Die hohe Zellmasse im Knochenmark und Blut kann also nicht mit einer erhöhten Zellverdopplungsrate erklärt werden, sondern eher mit der verlängerten Verweildauer der granulopoetischen Zellen in allen Reifungsstufen und der erhöhten Lebenszeit oder auch mit vermehrter Einfütterung von Stammzellen in den Proliferationsspeicher (Boll; 7,13,17).

Es liegen einige Untersuchungen über den Einfluß von CML-Seren auf die Proliferation von menschlichen Knochenmarkzellen *in vitro* vor (5,37,69). Bei einer zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse (17) ergaben sich Hinweise, daß Einfrieren die Wirkung von CML-Serum beeinflusst.

Leukopenie-Serum soll wie Serum von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie einen hohen Stimulatorenanteil enthalten (38).

Mangalik, Robinson und Moore (52,64) fanden bei Patienten mit cyclischer Neutropenie anticyclische Schwankungen der Colonie-stimulierenden Aktivität (CSA) in Urin und Serum. Während des Abfalls zur neutropenischen Phase war die CSA im Serum am höchsten. Es wurde außerdem festgestellt, daß die CSA im Serum von Patienten mit cyclischer Neutropenie mehrfach höher als im Serum normaler Menschen ist. Das Krankheitsbild der cyclischen Neutropenie ist charakterisiert durch einen abrupten Abfall der neutrophilen Granulozyten, mit dem Fieber, Haut- und Mundinfektionen einhergehen können. Nach 3 - 7 Tagen folgt ein Wiederanstieg der Leukozytenzahl. Die regelmäßigen Intervalle betragen 21 (15 - 35) Tage. Nicht in allen Fällen läßt sich eine familiäre Belastung finden (11).

Meuret und Fliedner (47) sind der Ansicht, daß diese Krankheit Folge einer zyklischen Verkleinerung des gesamten Proliferationsspeichers ist. Dadurch kommen die normalen

rhythmischen Schwankungen der Granulopoese im Knochenmark zur Auswirkung auf das Blutbild. Andere Untersucher (Guerry und Dale; 29 und 21) nehmen an, daß es sich um eine periodische Produktionsstörung der Granulopoese durch einen Defekt an der pluripotenten oder determinierten Stammzelle handelt (Boll; 11,16).

Da Mitogene zu erhöhter Stimulatorenfreisetzung aus Leukozyten führen sollen, erscheint es sinnvoll, die Wirkung des Überstandes einer normalen Leukozytenkultur nach Stimulation mit Pokeweed-Mitogen (PWM) auf das Wachstum von Knochenmarkzellkulturen zu untersuchen. Pokeweed ist der Name der in Nordamerika beheimateten Pflanze *Phytolacca americana*. Die Wurzel und Beere enthalten u.a. ein Saponin, das wie Phytohämagglutinin (PHA) eine mitogene Wirkung besitzt. PWM soll nach Douglas (23) und Mendes (43) hauptsächlich als B-Zell- und geringfügig als T-Zell-Stimulator in der Lymphopoese wirksam sein. Nach Cline und Golde (19) soll PWM wie auch PHA durch Stimulation von Lymphozyten und Stromazellen die Knochenmark-Regulationssysteme aktivieren und außerdem auf Granulozyten und Monozyten so einwirken, daß diese Stimulatoren freisetzen. Nach Astaldi und Sauli (1) ist die mitogene Wirkung von PWM als eine unspezifische polyclonale Aktivierung zu deuten, die durch vermehrte Granulozytenlyse verursacht sein soll.

1.2. FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die von vier CML-Patienten stammenden Knochenmarkzellen nach Anzucht in der von Boll und Collmann (15) entwickelten Suspensionskultur

1. auf ihre Lebensfähigkeit in verschiedenen Medien über einen Zeitraum bis zu 16 Tagen zu untersuchen. Die Proliferationsleistungen und Differenzierungsfähigkeit in Medien mit verschiedenen Zusätzen wurden verglichen.

Dabei handelte es sich um Kulturansätze

- a) mit reinem chemisch definiertem Nährsubstrat (RPMI),
- b) RPMI mit Zusatz des Überstandes einer 5-Tage-Leukozytenkultur eines Gesunden,
- c) RPMI mit Zusatz von 40 % autologem oder heterologem CML-Serum (frisch und gefroren),
- d) RPMI mit Zusatz von 40 % menschlichem Leukopenie-Serum.

2. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Anzucht von Knochenmarkzellen nach FICOLL-Separation (mit einem daraus resultierenden Anteil von Teilungsfähigen bis zu 80 %) zu wesentlich anderen Erkenntnissen führt.

2. METHODE UND MATERIAL

2.1. Methode

2.1.1. Kulturansatz (Suspensionskultur)

Für die vorliegenden 16 Versuche wurden Knochenmarkpunktate von 4 Patienten mit CML benutzt, von denen keiner zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter zytostatischer Behandlung stand.

Die Punktate wurden in jeweils 10 ml heparinisierte (5-10 E/ml) HANK's-Lösung gebracht (gepufferte Salzlösung: 0,35 g/l NaHCO_3 ; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, 4832 USA).

Mittels Passage durch Kanülen abnehmenden Durchmessers (0,9; 0,8; 0,7; 0,55 mm) wurden die Knochenmarkbröckel homogenisiert.

Durch Verdünnung mit RPMI-Medium 1640 (ROSEWELL-PARK-MEMORIAL Institut Buffalo) und unten beschriebener Serumzusätze wurde eine Einstellung der Zellzahl auf 2000/ μ l angestrebt (1,36). Die Kontrolle erfolgte durch Zählung der kernhaltigen Zellen in der Schilling-Zählkammer. Für jede der auf die Dauer von 14 - 16 Tagen angelegten 4 Kulturreihen (eine Kulturreihe entspricht den Knochenmarkzellen eines Patienten) wurden 3 - 5 Kulturansätze benötigt, je nach Anzahl der noch zu beschreibenden Zusätze (Übersicht Tab. 1, Seite 19).

Um eine Infektion zu vermeiden, wurde allen Ansätzen ca. 30 μ g Streptomycin/Ampicillin zugesetzt.

Von jedem Ansatz wurde je 1 ml in 5 oder 6 Eppendorf-Gefäße (Fassungsvermögen 1,5 ml) gebracht und bei 37⁰ C inkubiert. Diese Proben blieben bis zum Entnahmetag ungeöffnet.

Von jeder der erhaltenen 93 Stichproben wurden wie auch bei den 4 Null-Stichproben die Gesamtzellzahl bestimmt und drei Ausstriche mit Hilfe der Zytozentrifuge (500 U/min = 22 x g, 5 min) angefertigt.

2.1.2. FICOLL - SEPARATION

Durch FICOLL-Dichte-Gradienten-Separation erfolgte bei zwei der vier Kulturreihen (III u. IV) eine Auftrennung der homogenisierten Knochenmarkzellen in zwei Fraktionen. Im einzelnen erfolgte das durch 30-minütiges Zentrifugieren in FICOLL-Metrizoat-Lösung (Fa. Seromed München) mit einer Dichte von $1,077 \text{ g/cm}^3$ bei 3000 U/min. Der Überstand, der erfahrungsgemäß über 80 % mononukleäre Zellen enthält, wurde abgesaugt und nach oben beschriebenem Verfahren kultiviert.

2.1.3. AUSWERTUNG

Von jedem nach Pappenheim gefärbten Ausstrich wurden 2.000 Zellen und die dazugehörigen Mitosen nach den von Boll (13) genannten Kriterien differenziert.

17 Stichproben konnten wegen schlechter Qualität nicht ausgewertet werden (Tab. 1, S. 19).

Somit liegt dieser Arbeit die Zählung von ca. 160.000 Zellen zugrunde.

Folgende Parameter wurden untersucht:

Reifungskurven: Additiv aufgetragen zeigen sie die Differentialverteilung der Zellen der Granulopoese in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Abgebildet wurden auch Mono- und Megakaryopoese sowie lymphatische Zellen und Erythropoese. Die Differentialverteilung wurde nicht nur durch die absoluten Zellzahlen, sondern auch durch die prozentuale Verteilung veranschaulicht. Um die Ergebnisse überschaubarer zu machen, wurde eine Zusammenfassung nach folgenden Zellgruppen vorgenommen (in Klammern die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen):

1. Myeloblast (mb)
2. Promyelozyt (prom)
3. Myelozyt incl. eosinophiler und basophiler Myelozyt und Metamyelozyt (my + mm)
4. Stabkernige und Segmentkernige Granulozyten incl. eos. und bas. Segmentkernige (st + seg)
5. Nekrobiose von segmentkernigen Granulozyten (neg) (vgl. Undritz: Lit.-Verz. 72, plate 54)
6. Nekrose-Zellen (nek)

7. Zellen der Megakaryopoese (meg)
8. Zellen der Monopoese incl. Makrophagen (mo)
9. Zellen der Lymphopoese und des Retikulums (ly + ret)
10. Zellen der Erythropoese (ebl)

In den Reifungskurven mit Aufzeichnung der absoluten Zellzahl wurde auf die Gruppen 7, 9 und 10 verzichtet, weil die Anzahl zu klein war.

Mitose-Index: Dieser Index errechnet sich aus der Zahl der Mitosen von 1.000 teilungsfähigen Zellen.

Zu den teilungsfähigen Zellen der Granulopoese gehören: Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten, Monoblasten und Promonozyten.

Granulopoetischer Reifungsindex (modifiziert):

Der granulopoetische Reifungsindex nach BOCK, der als Kriterium für den Grad der Ausreifung gilt, wurde modifiziert. Der Summe aller Zellen der Granulopoese im Zähler steht die Summe der teilungsfähigen Granuloblasten im Nenner gegenüber (GZ/GBI). Ein Wert von ca. 2 würde den Verhältnissen in normalem Knochenmark entsprechen. Bei erhöhtem Index ergibt sich somit eine Ausreifungsbeschleunigung, bei erniedrigter eine Ausreifungshemmung und bei dem Grenzwert 1 ein Ausreifungsstopp wie bei akuter Leukämie.

Zellmorphologie: Bei den mikroskopischen Untersuchungen wurde auf ungewöhnliche Zellen (wie Immunoblasten und Megakaryoblasten) sowie auf Nekrobiose und Nekrose der Granulozyten geachtet.

Der Immunoblast ist eine lymphoide Zelle von der Größe eines Proerythroblasten. Der exzentrisch liegende Kern ($\varnothing$ 10 μ) hat eine retikuläre "Blastenstruktur" mit 1-3 Nukleolen. Das Zytoplasma zeigt schwache bis stärkere Basophilie sowie eine Vakuolisierung. Die Zellgrenzen sind oft unregelmäßig (Klassifikation bei Krüger (35) und Boll (13)).

Stammzellen als sog. "Nullzellen" und die determinierten Stammzellen lassen sich weder mikroskopisch noch histochemisch eindeutig als solche erkennen. Nach kinemato-graphischen Kriterien haben diese Zellen, die den Knochenmarklymphozyten ähneln, eine schwache retikuläre Kernstruk-

tur, sie enthalten kein oder wenig basophiles Zytoplasma.

Statistik

Zur Feststellung, ob die in den einzelnen Ansätzen beobachteten Mitosen (M_O) nach statistischen Kriterien verschiedenen Populationen zuzuordnen sind (Ablehnung der Nullhypothese), wurde eine Signifikanzberechnung nach dem χ^2 -Test von Pearson und Kontinuitätskorrektur (Yates-Korrektur bei Werten von M_O , die weniger als 5 waren) durchgeführt (18).

χ^2 ist das Maß für die Übereinstimmung vergleichbarer Werte und errechnet sich aus der Summe von $\chi^2 = \frac{(O-E)^2}{E}$ aus der "Zwei-mal-zwei-Felder"-Tafel mit einem Freiheitsgrad von 1 (Vergleich zweier Werte).

Kontinuitätskorrektur nach Yates bei Claus und Ebner (18).

p ist das Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß die verglichenen Werte aus derselben Population stammen.

$p > 0,05$: Es handelt sich um eine geringe Differenz zwischen den beiden Werten (nicht signifikant).

$0,05 > p > 0,025$: Es bestehen Zweifel, ob eine ausreichende Differenz besteht (schwach signifikant).

$0,025 > p > 0,01$: Es bestehen kaum Zweifel über eine ausreichende Differenz (signifikant).

$p < 0,01$: Der Unterschied zweier Werte ist ausreichend von Null verschieden (hoch signifikant).

Die Werte für p wurden einer Tabelle (42) entnommen.

Abkürzungen:	M_O :	beobachtete Mitosen (observed)
	N_O :	Zellen in Interphase (Nicht-Mit.)
	E:	erwartete Werte (expected)
	O:	beobachtete Werte (observed)
	p:	Wahrscheinlichkeit (probability)
	s.:	signifikant

2.2. Material

2.2.1. Knochenmarkzellspender: Kulturreihe I

Sternalpunktat der Pat. A.M., 84 Jahre, vom 2.8.80

Diagnosen: Chronisch-myeloische Leukämie, seit Dez. 79
bekannt; Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus

Therapie vor Punktion: Pentifyllin 1,2 g mit Nicotin-
säure 0,3 g; Glibenclamid 15 mg; Acetyldig-
oxin 0.25 mg; Furosemid 20 mg; (täglich)

Klinik: Milz: 3 cm unterhalb des Rippenbogens
Leber: 5 cm unterhalb des Rippenbogens
Lymphome: re. Kieferwinkel (2 x 1 cm)
 axillär re. (1 x 1 cm)
 supraclaviculär (2 x 2 cm)

Laborbefunde: BSG 55/105

ALP 0

Philadelphia-Chromosom: nicht untersucht

Blutbild/Differenzierung:	Mbl:	0
Erythrozyten: $3,15 \times 10^6/\mu\text{l}$	Promy:	4
Hämoglobin: 9,8 g/100 ml	My:	11
Thrombozyten: $255 \times 10^3/\mu\text{l}$	Metamy:	9
Leukozyten: $217 \times 10^3/\mu\text{l}$	Stab:	23
	Segm:	34
	Bas:	5
	Eos:	2
	Mono:	5
	Ly:	4
	AMZ:	3

Knochenmarkbefund (2.8.80):

Ausstrich: zellreich, fettarm; gr. und kl. Retikulum-
zellen, Lymphoz. und Plasmazellen vermindert;
Granulopoese: stark vermehrt; POX u. PAS gut pos.; Eos. ver-
mehrt; Promono- u. Monozyten normal
Erythropoese: wenig vermindert, nicht verschoben, normobla-
stisch; Ebl nicht PAS-pos.; keine Fe-Speicherung
Thrombopoese: keine Megakaryoblasten, Megakaryozyten in allen
Reifungsstufen, reichlich Mikrokaryozyten

Kulturreihe II

Yamshidi-Beckenkampunktat des Pat. A.G., 91 Jahre, vom
14.12.79

Diagnosen: Chronisch-myeloische Leukämie
Epistaxis, Pneumokokkenpneumonie,

Therapie vor Punktion: Methyldigoxin 0,2 mg/die

Klinik: Milz: 4-5 cm vergrößert
Leber: 6-8 cm vergrößert
Epistaxis seit 4 Wochen

Laborbefunde: BSG 59/93

ALP 0

Philadelphia-Chromosom: nicht untersucht

Blutbild/Differenzierung:	Mbl:	12
Erythrozyten: $3,9 \times 10^6/\mu\text{l}$	Promy:	23
Hb: 12,9 g/100 ml	My:	3
Thrombozyten: $231 \times 10^3/\mu\text{l}$	Metamy:	6
Leukozyten: $318 \times 10^3/\mu\text{l}$	Stab:	16
	Segm:	36
	Bas:	3
	Eos:	0
	Mono:	0
	Ly:	1

Knochenmarkbefund (14.12.79):

Ausstrich: zellreich, fettarm; gr. Retikulumzellen vermindert, a-NA-Esterase granulär pos.; kleine Ret.-Zellen vermindert; Prolymphozyten, Lymphoblasten und Immunoblasten keine; Plasmazellen vermindert;

Granulopoese: deutlich vermehrt, vorwiegend Myeloblasten und Promyelozyten, Mitosen vorhanden, POX u. PAS gut positiv; Promono- und Monozyten stark vermehrt, a-NA-Esterase diffus positiv; Eos. wenig vermehrt

Erythropoese: wenig vermindert, rechtsverschoben, Mitosen vorhanden; Megaloblastoide vorhanden; Hämocytoblasten keine, Siderozyten keine

Thrombopoese: Megakaryoblasten vorhanden, Megakaryozyten in allen Reifungsstufen reichlich, Mikrokaryozyten reichlich

Kulturreihe III

Beckenkammpunktat des B.-H. K., 30 Jahre, vom 30.1.80

Diagnosen: Chronisch-myeloische Leukämie

Therapie vor Punktion: Indometazin-Kapseln

Dexamethason (Spray)

Klinik: Milz: 5 cm vergrößert

Leber: 3 cm vergrößert

Lymphome: suboccipital (2 x 2 cm)

in der Leistenregion mehrere kleine
seit 1973 Heuschnupfen (Zust. nach Desensi-
bilisierung); seit Okt. 79 Schmerzen in re.
und li. Hüfte und Bein;

Laborbefunde: BSG 46/65

ALP 1

Philadelphia-Chromosom: positiv

Blutbild/Differenzierung:	Mbl:	0
Erythrozyten: $3,86 \times 10^6/\mu\text{l}$	Promy:	10
Hb: 12,1 g/100 ml	My:	5
Thrombozyten: $171 \times 10^3/\mu\text{l}$	Metamy:	9
Leukozyten: $135 \times 10^3/\mu\text{l}$	Stab:	13
	Segm:	53
	Bas:	1
	Eos:	1
	Mono:	3
	Ly:	5

Knochenmarkbefund (4.2.80):

Ausstrich: zellreich, fettarm; gr. und kleine Retikulun-
zellen vermindert; Blut-Lymphozyten vermind.;
Plasmazellen vermindert;

Granulopoese: vermehrt, linksverschoben, vorwiegend Myelo-
blasten, Promyelo- und Myelozyten; POX-pos.,
PAS- gut pos., Eos. stark vermehrt;

Erythropoese: stark vermindert, nicht verschoben; Erythro-
blasten nicht PAS-pos.; Fe-Speicherung keine

Thrombopoese: Megakaryblasten vermehrt, reichlich Megakaryo-
zyten in allen Reifestufen; Mikrokaryozyten

Histol. Knochenbefund: CML ohne Markfibrose

Kulturreihe IV

Beckenkamm punktat von E.Z., männlich, 80 Jahre, vom 30.1.80

Diagnosen: Chronisch-myeloische Leukämie (seit Juli 77 bekannt), Übergang in OMS wahrscheinlich im hypertrophen Vorstadium; Diabetes mellitus

Therapie vor Punktion: Acetyldigoxin 0,4 mg/d; Allopurinol 200 mg; bis 2.8.78 Busulfan

Klinik: im Mai 77 Aufnahme wegen Pyelonephritis, CML ohne Behandlungsnotwendigkeit (Leukozytenzahl $32 \times 10^3/\mu\text{l}$, ALP 8)

Milz: 3 cm vergrößert

Leber: 4 cm vergrößert

Lymphome: axillar links (1 x 1 cm)

Laborbefunde: BSG 35/81

ALP 262

Philadelphia-Chromosom: negativ

Blutbild/Differenzierung:	Mbl:	0
Erythrozyten: $3,6 \times 10^6/\mu\text{l}$	Promy:	5
Hb: 10,6 g/100 ml	My:	10
Thrombozyten: $111 \times 10^3/\mu\text{l}$	Metamy:	12
Leukozyten: $55 \times 10^3/\mu\text{l}$	Stab:	28
	Segm:	38
	Bas:	1
	Eos:	2
	Mono:	0
	Ly:	4

Knochenmarkbefund (20.3.79):

Ausstrich: zellreich, fettarm, gr. u. kl. Ret.-Zellen normal; Lymphoblasten fehlen

Granulopoese: vermehrt, linksverschoben, Monoblasten vermehrt; POX- und PAS gut pos.; Eos. normal

Erythropoese: normoblastisch, Erythroblasten nicht PAS-positiv; Fe-Speicherung im Retikulum fehlt

Thrombopoese: reichlich Megakaryozyten in allen Stufen, Mikroakaryozyten kommen vor; im Vergleich zum Vorpunktat zunehmende Verdrängung der Erythropoese

2.2.2. Spender des Leukopenieserums

Serum der Pat. V.D., 36 Jahre; im Mai 1976 wurde Serum eingefroren

Diagnosen: Leukopenie mit allergischer Diathese (seit 1967 bekannt) - Verdacht auf cyclische Neutropenie

Klinik: Milz nicht tastbar
Leber nicht vergrößert

Laborbefunde: BSG 17/30
ALP 68
die Leukozytenzahlen schwankten cyclisch zwischen 500 und 3.800/ μ l

Blutbild/Differenzierung (vom 4.5.76):

Erythrozyten:	$4,05 \times 10^6$ / μ l	Mbl:	0
Thrombozyten:	143×10^3 / μ l	Promy:	0
Leukozyten:	$2,4 \times 10^3$ / μ l	My:	0
Segmentkern.:	$1,25 \times 10^3$ / μ l	Metamy:	0
		Stab:	1
		Segm:	52
		Eos:	1
		Bas:	1
		Mono:	7
		Ly:	38

Knochenmarkbefund (v. Nov. 1978):

Ausstrich: zellreich, mittlerer Fettgehalt, gr. u. kl. Retikulumzellen normal, Lymphozyten stellenweise stark vermehrt; Plasmazellen vermehrt, atypische Plasmazellen kommen vor

Granulopoese: wenig Mitosen, Riesenstäbe; POX- und PAS-gut positiv, Eos. wenig vermehrt

Erythropoese: wenig vermehrt, nicht verschoben, normoblastisch, Megaloblastoide kommen vor, Fe-Speicherung im Retikulum fehlt

Thrombopoese: Megakaryozyten in allen Reifungsstufen

2.2.3. ZUSÄTZE

2.2.3. RPMI 1640

RPMI 1640 ist ein handelsübliches Gewebezüchtungsmedium, es enthält neben verschiedenen Salzen Puffer, Aminosäuren (ohne Glutamat) und Glukose (200 mg/100 ml) als Energieträger. Pro Ansatz wurden 4 E Alt-Insulin zugesetzt. Alle 16 Kulturansätze enthielten RPMI als Nährmedium, wobei jeweils der erste Ansatz einer Kulturreihe ohne weitere Zusätze blieb ("Kontrollansätze").

2.2.3.2. Pokeweed-Mitogen-Überstand (PWM-ÜST)

Verwendung fand das Leukozyten/Erythrozytenkonzentrat eines Gesunden (R., Hann.). Diesem wurde PWM (Fa. Gibco) in einer Konzentration von 10 % und als Nährlösung RPMI zugesetzt. Nach 5-Tage-Kultivierung im Brutschrank wurde der Überstand dieser Kultur gewonnen, eingefroren und nach dem Wiederauftauen in einer Verdünnung von 1:10 den Ansätzen 2, 6 und 10 hinzugefügt.

2.2.3.3. CML-Seren

In den Kulturreihen I, III und IV wurde in jeweils einem Ansatz frisches Eigenserum zugesetzt (CML-ES fr). Zum Vergleich wurde in den Kulturreihen III u. IV auch gefrorenes Eigenserum (Gefrierdauer 6 h) verwendet (CML-ES gefr.).

2.2.3.4. CML-Fremdserum (CML-FrS gefr.)

Gefrorenes Serum der Pat. aus Kulturreihe I (Gefrierdauer 3 d) wurde einem Ansatz der Kulturreihe II zugesetzt. Diese Kulturansätze enthielten einheitlich 40 % CML-Serum.

2.2.3.5. Leukopenieserum

Das verwendete Serum stammt von der im Absatz 2.2.2. vorgestellten Patientin mit Verdacht auf cyclische Neutropenie. Es wurde bei einer peripheren Leukozytenzahl von 1250/ μ l abgenommen und war ca. 3 Jahre lang eingefroren. Je ein Ansatz der Versuchsreihe I, II u. III erhielt diesen Serumzusatz in einer Konzentration von 40 %.

2.3. TABELLE 1: Übersicht der Ansätze (1 - 16); Zeitpunkt (d) der Stichprobenentnahme;

(in Klammern nicht auswertbare Stichproben)

Je Stichprobe wurden 2.000 Zellen differenziert.

Medium	R P M I (100 %)	P W M - Ü S T (10 %)	CML ES frisch (40 %)	CML ES gefr. (40 %)	CML FrS gefr. (40 %)	Leukopenie-S. (40 %)
Kultur- Tage	O/2/4/6/8/11 (16)	2/4/6/8/11/16	2/4/6/8/11/16			2/4/6/8/11/16
Versuchs- serie I	Ansatz 1	2	3			4
Abbildung	1, 2,	3, 4,	5, 6,			7, 8,
Seite	22	23 u. 24	25 u. 26			27 u. 28
Kultur- Tage	O/1/3/5/7/10 (14)	1/3/5/7/10 (14)			1/3/5/7/10 (14)	1/3/5/7/10 (14)
Versuchs- serie II	Ansatz 5	6			7	3
Abbildung	10, 11	12, 13			14, 15	16, 17
Seite	32	33			34	35
Kultur- Tage	O/2/5/7 (9/12/14)	2/5 9 (7) (12/14)	2/5/7/9 (12/14)	2/5/7/9/12 (14)		2/5/7/9/12/14
Versuchs- reihe III	Ansatz 9	10	11	12		13
Abbildung	19, 20	21, 22	23, 24	25, 26		27, 28
Seite	39	40	41	42		43 u. 44
Kultur- Tage	O/2/4/7 (11/15)		2/4/7/11 (15)	2/4/7/11/15		
Versuchs- reihe IV	Ansatz 14		15	16		
Abbildung	30, 31		32, 33	34, 35		
Seite	48		49	50 u. 51		

3. ERGEBNISSE

3.1. Kulturreihe I

Knochenmark der Pat. M.; ohne Ficoll-Separation
Der Originalansatz enthielt 1.600 Zellen/ μ l.

3.1.1. Ansatz Nr. 1 (ohne Zusätze), Abb. 1,2,9

Die Zellen konnten bis zum 11. Tag differenziert werden. Wie anhand der Reifungskurven (S. 22) zu sehen ist, erfolgte bis zum 4. Tag eine starke Granuloblastenproliferation, kenntlich an der Zellvermehrung, während die Differentialverteilung (S. 22) relativ konstant blieb. Mit dem Auftreten der ersten nekrobiotischen Granulozyten kam es ab 6. Tag zu einem raschen Zellzahlabfall vor allem bei den stab- und segmentkernigen Granulozyten. Zur gleichen Zeit nahm die Monopoese absolut und relativ zu. Bis zum 4. Tag stieg die Myeloblastenzahl auf das Doppelte an, fiel aber bis zum 11. Tag wieder ab.

Die weißen Mitose-Indices zeigten keinen Zusammenhang mit der Reifungskurve, da die Werte länger hoch blieben (s. wMI unter Abb. 1).

In Abb. 9, S. 29, wird der modifizierte Reifungsindex in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt. Es zeigt sich eine relativ flache biphasische Kurve.

3.1.2. Ansatz Nr. 2 (Zusatz von Pokeweed-Mitogen-Überstand) Abbildung 3,4,9

Die Zellen konnten bis zum 16. Tag differenziert werden. Bis zum 4. Tag stieg die Granulozytenzahl bei gleichzeitig hohem Mitoseindex (am 2. Tag 12,9 ‰). Ab 4. Tag kam es zu starker Zunahme der Nekrobiose der Granulozyten und Zunahme der Monopoese (Abb. 4, S. 24). Zwischen 6. und 8. Tag fiel die Zahl aller Zellen stark ab. Die Lymphopoese nahm bis 8. Tag schwankend ab, dann aber deutlich wieder zu (Abb. 4); ab 11. Tag traten Immunoblasten (1,4 ‰) auf (nicht dargestellt).

3.1.3. Ansatz Nr. 3 (Zusatz von frischem CML-Eigenserum)
Abb. 5,6,9

Der Gipfel der Zellzahl wurde am 4. Tag erreicht. Bis zum 16. Tag blieb ein hoher Anteil der Stab- und Segmentkernigen bei etwa konstanter Verteilung der Zellen der Granulopoese (Abb. 6, S. 26).

Bei abnehmenden Mitose-Indices von 8,7 auf 1,9 ‰ bis zum 11. Tag (Tabelle 2, S. 54) zeigte sich eine Beschleunigung der Ausreifung (GZ/GBl-Index Abb. 9, S.29).

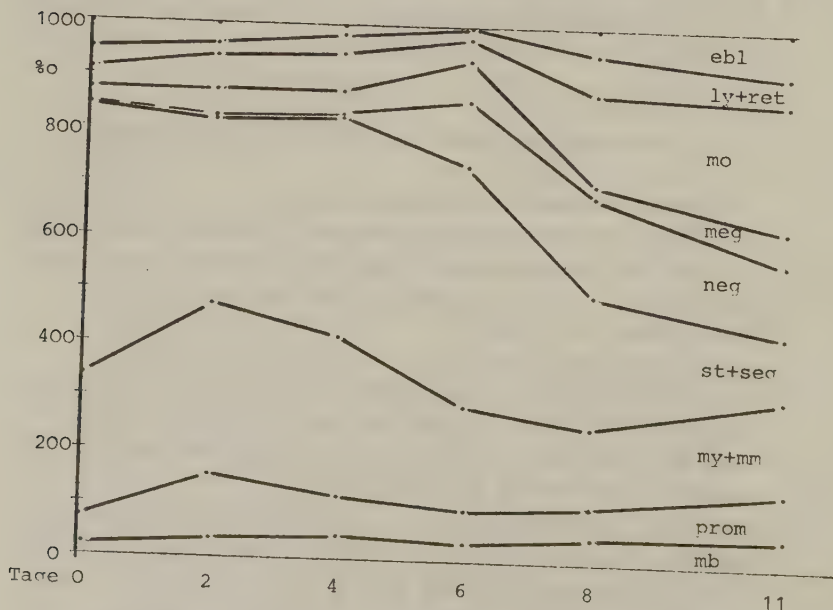
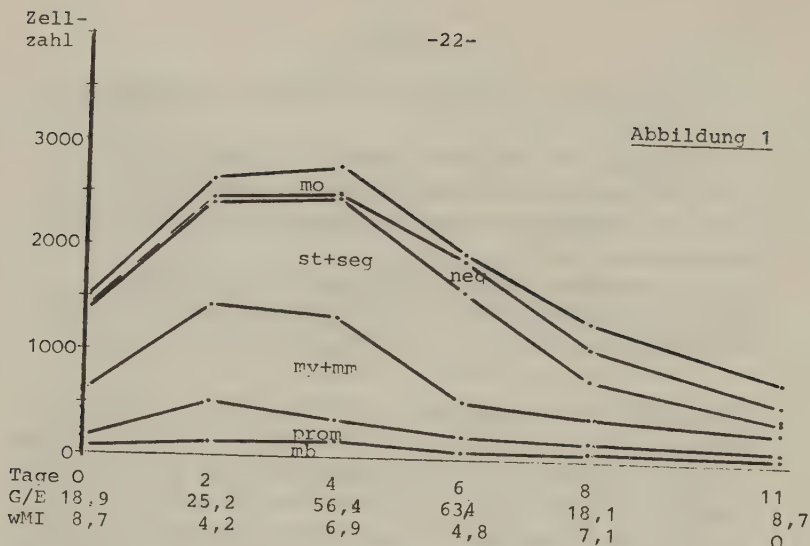
Folgende Beobachtungen bei der Differenzierung der Zellen dieses Ansatzes sind bemerkenswert: Zwischen 4. und 6. Tag zeigten sich Immunoblasten (Zellmorphologie S. 11) mit einem Anteil von 0,95 - 1,1 ‰ an der Gesamtzellzahl, und pyknotische Granulozyten lagen vermehrt an den Makrophagen. Ab 8. Tag zeigten sich Makrophagenkolonien; am 11. Tag wurden große teraploide Promonozyten und am 16. Tag starke Vakuolisierung in allen Zellen beobachtet.

3.1.4. Ansatz Nr. 4 (Zusatz von heterologem Leukopenie-Serum) Abb. 7,8,9

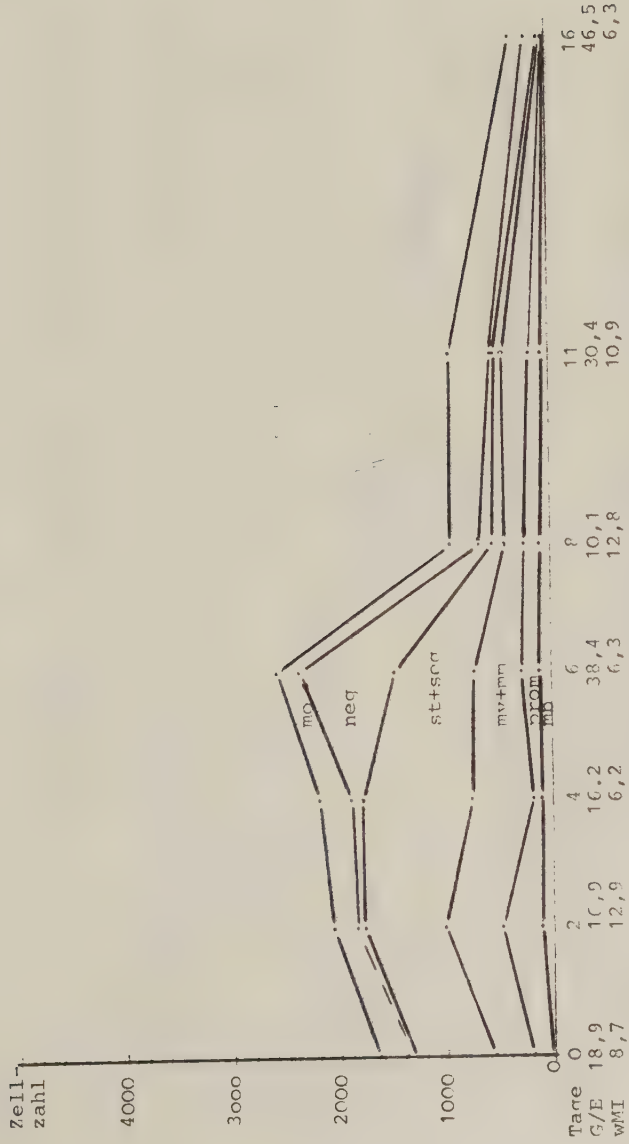
Die Reifungskurven zeigten das Maximum der Zellzahl hier am 2. Tag und danach einen langsamen linearen Abfall bis zum 16. Tag (Abb. 7, S. 27). Mit dem langsamen Abfall der Granulopoese konnte ein Anstieg der Monopoese beobachtet werden (Abb. 8, S. 28).

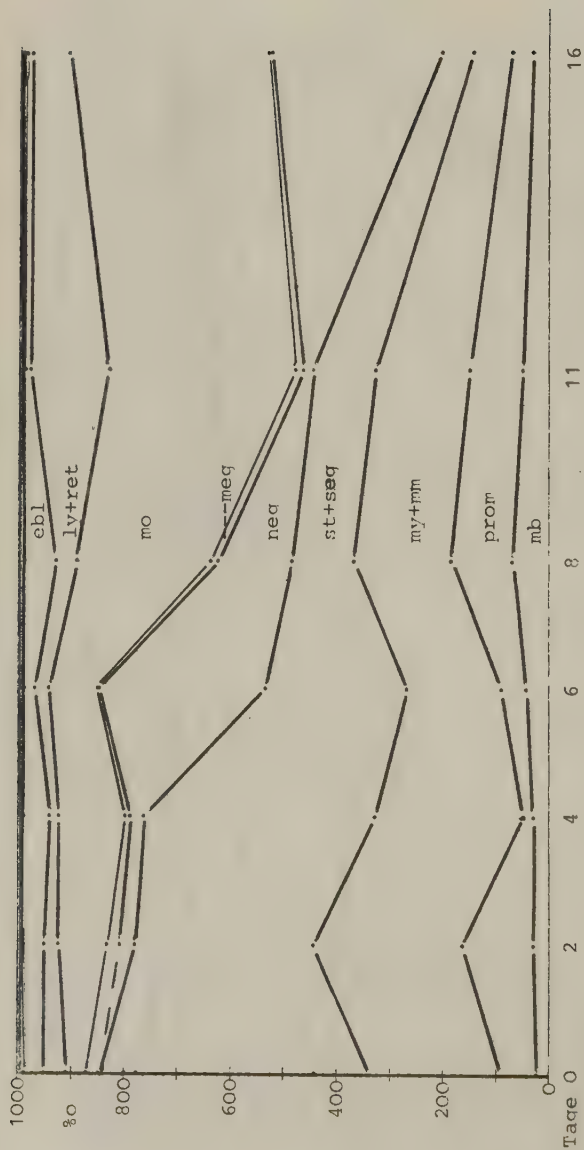
Der Mitose-Index stieg am 16. Tag auf 14,3 ‰ an. Beim Mikroskopieren dieser Zellen fielen ab 2. Tag kleine "stammzell-ähnliche" Zellen (Zellmorphologie S. 11) und eine ab 6. Tag auftretende hohe Makrophagen-Anzahl auf. Immunoblasten wurden nicht gesehen.

Der Anteil der Erythropoese (s. G/E-Indices) war bei allen Ansätzen dieser Kulturreihe ausgesprochen gering. Bei der hier beobachteten geringen Anzahl von Zellen der roten Reihe sind die Schwankungen der G/E-Indices während der Kulturdauer nicht aussagekräftig.



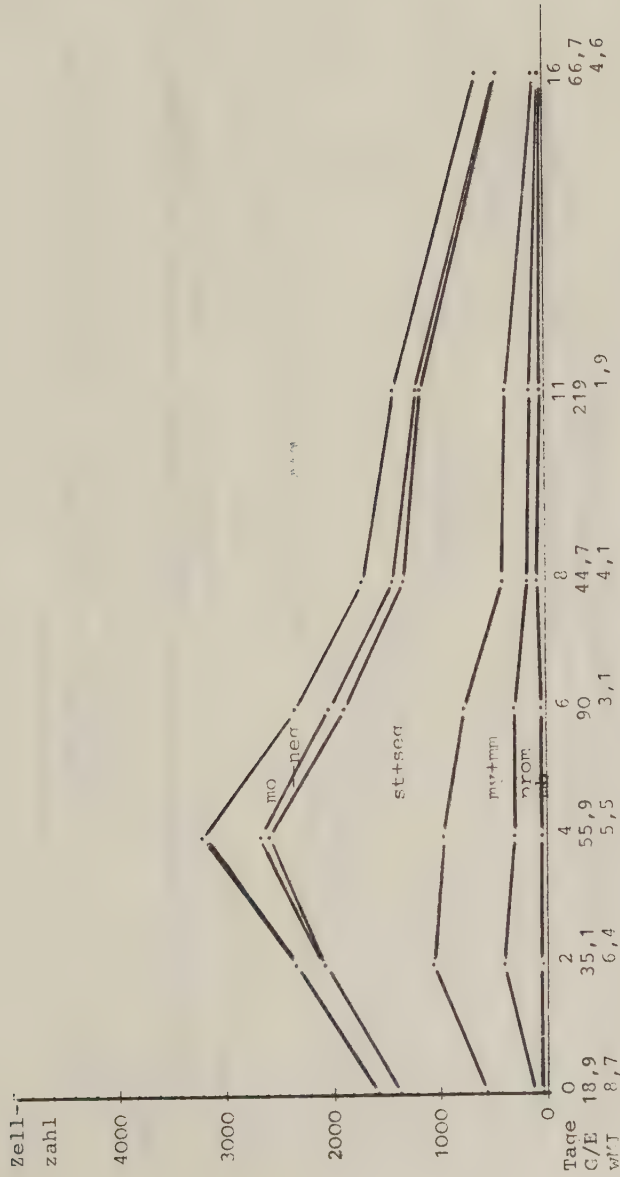
Reifungskurven des Ansatzes Nr. 1 (Kulturreihe I)
 CML-Knochenmark in RPMI-Medium
 absolute Granulozytenzahl (Abb. 1);
 Relativwerte aller Knochenmarkszellen (Abb. 2);
 (Abkürzungen s.S. 10)





Reifungskurven des Ansatzes Nr. 2 (Kulturreihe I)

CML-Knochenmark in p₇₇-Überstand, Relativwerte aller Knochenmarkzellen



Reifungskurven des Ansatzes Nr. 3 (Kulturreihe I)
C/L-Knochenmark in C/L-Eiconserum (frisch), absolute Granulo-
zytenzahl

Abbildung 5

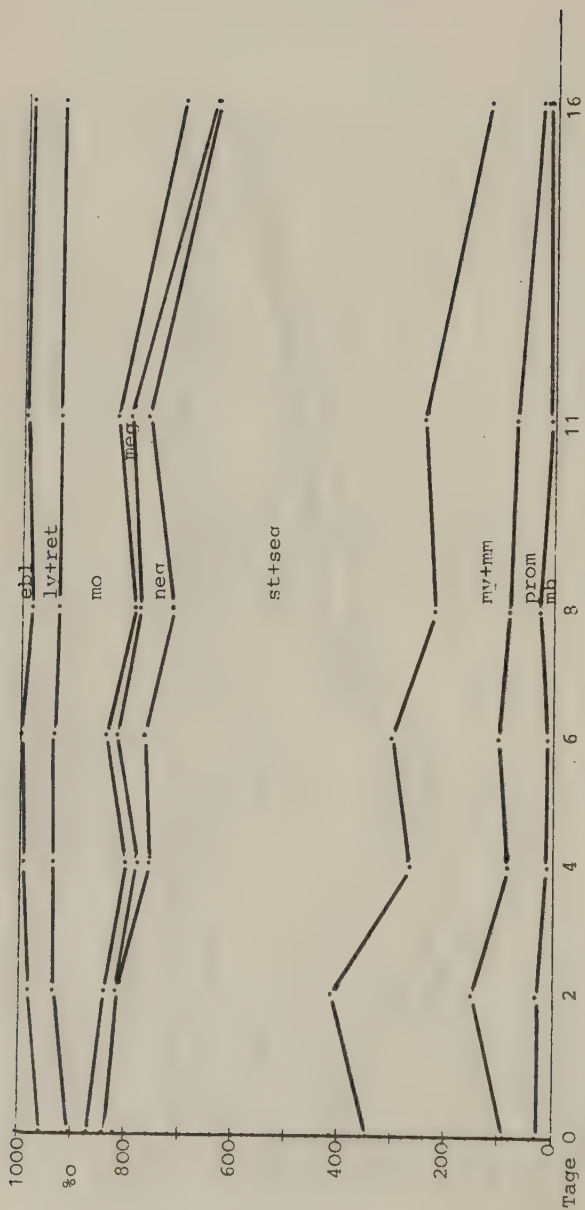


Abbildung 6
Reifungskurven des Ansatzes Nr. 3 (Kulturreihe I)
CML-Knochenmark in CMJ-Eigenserum (frisch), Relativwerte aller
Knochenmarkzellen

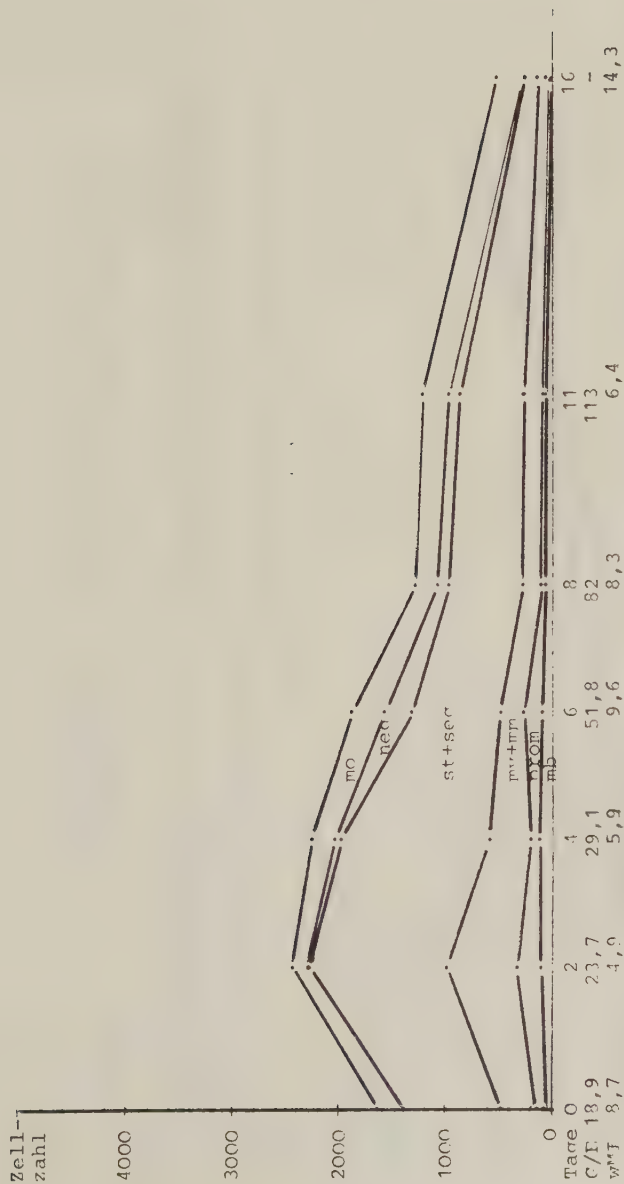
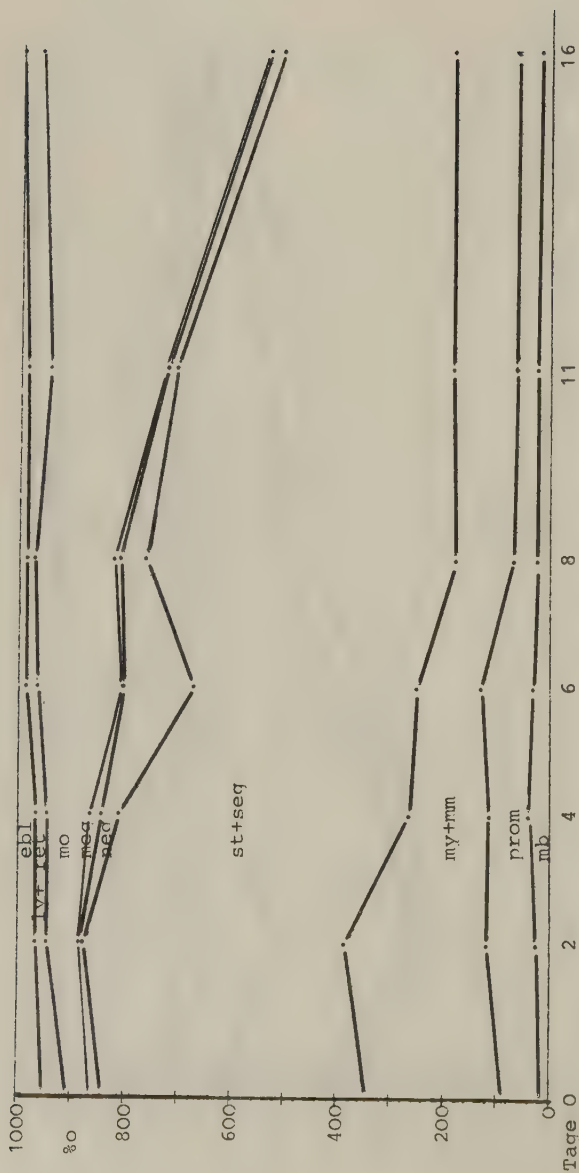


Abbildung 7 Reifungskurven des Ansatzes Nr. 4 (Kulturreihe I)
CML-Knochenmark in Leukopenie-Serum, absolute Granulozytenzahl



Reifungskurven des Ansatzes Nr. 4 (Kulturreihe I)
CML-Knochenmark in Leukonenie-Serum, Relativwerte aller
Knochenmarkzellen

Abbildung 8

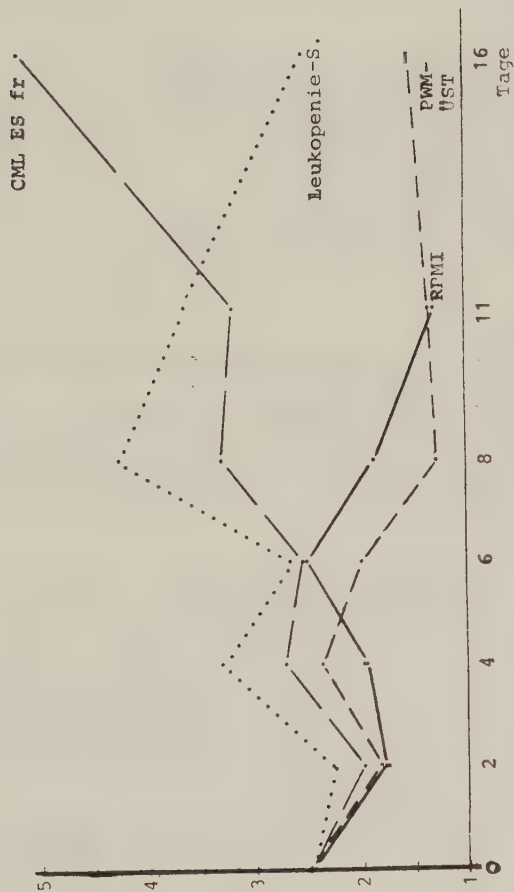


Abbildung 9 Granuloetischer Reifungsindex (modifiziert) - Kulturreihe I
 = Gesamtzahl der Granulopoese (Erläuterung s.S. 11)
 Granuloblasten (teilungsfähig)

3.2. Kulturreihe II (Pat. G.; ohne Ficoll-Separation)

Der Originalansatz enthielt 3.800 Zellen/ μ l. Bei allen Ansätzen war eine Differenzierung bis zum 10. Tag möglich.

3.2.1. Ansatz Nr. 5 (ohne Zusätze) Abb. 10, 11, 18

Bereits am 1. Tag und dann noch einmal am 5. kam es zu einem starken Zellzahlabfall. Danach traten viele nekrobiotische und nekrotische als auch vermehrt monopoetische Zellen auf (Abb. 10, S. 32).

Der Mitose-Index (s. wMI unter Abb. 10) blieb um 10 ‰ relativ konstant. Der modifizierte Reifungsindex (Abb. 18, S. 36) stieg nur am 1. bis 3. Tag an und blieb dann am Ausgangswert.

Der Anteil der Erythropoese war ausgesprochen gering (siehe G/E-Indices unter Abb. 12, S. 33).

Besonders zu erwähnen sind das Auftreten einiger Immunoblasten (0,9 ‰ am 1. und 1,7 ‰ am 3. Tag) und das Vorkommen toxischer Granulation der reifen Granulozyten ab 5. Tag.

3.2.2. Ansatz Nr. 6 (Zusatz von PWM-ÜST) Abb. 12, 13, 18

Bis zum Ende der Kultur blieb die Zahl der Granuloblasten im absoluten Bereich nahezu unverändert. Der Anteil der nicht mehr teilungsfähigen Zellen blieb bis zum 7. Tag relativ hoch, um dann mit dem Auftreten von Nekrose-Zellen abzusinken (Abb. 12, S. 33). Im Vergleich zu den anderen Ansätzen dieser Kulturreihe zeigte sich ein geringerer Abfall der Gesamtzellzahl.

Ab 2. Tag blieb die Monopoese relativ konstant, während die Lymphopoese am 1. Tag bei 1 ‰ lag und fallende Tendenz zeigte (Abb. 13).

Der Mitose-Index fiel von 10 auf 2,2 ‰ bis zum 7. Tag ab. Der Wert von 14 ‰ am 10. Tag ist wegen geringer Zellzahl fragwürdig.

Auffällig war das Auftreten von Riesenstäben; Immunoblasten fehlten.

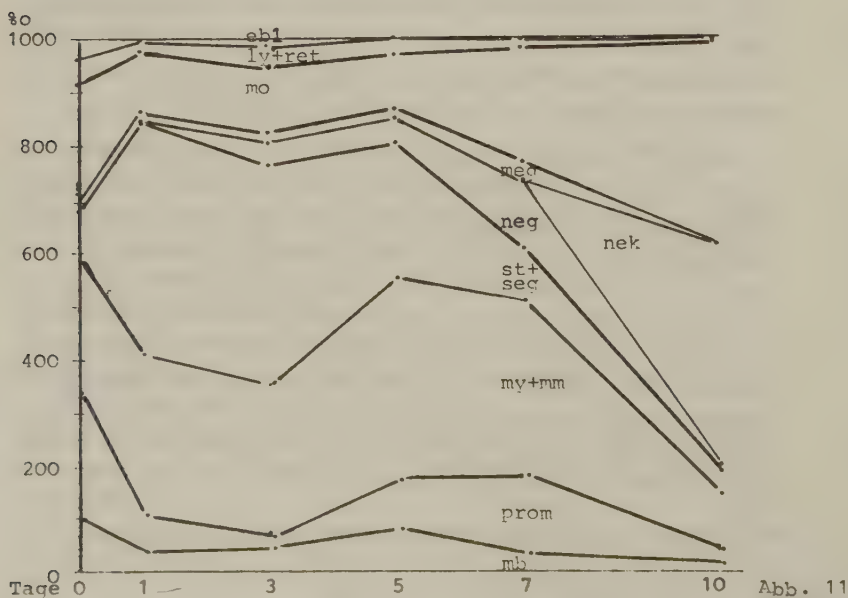
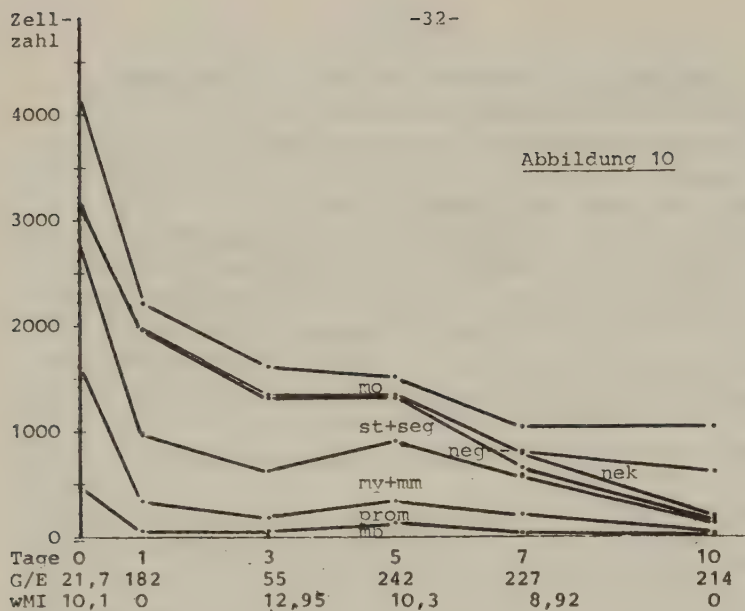
3.2.3. Ansatz Nr. 7 (Zusatz von gefrorenem CML-Fremd-Serum) Abbildung 14,15,18

Bei nahezu linearem Abfall der Gesamtzellzahl (schon in den ersten 24 Stunden um 1.000 Zellen) vergrößerte sich der Anteil der nicht Teilungsfähigen von ca. 15 % auf 70 % (Abb. 14, S. 34). Die Teilungsfähigen nahmen stärker ab als in RPMI-Medium und PWM-ÜST, obgleich der wMI höher blieb. Der wMI war am 3. und 5. Tag mit 17 bzw. 21 % sehr hoch, ab 5. Tag zeigte sich dann ein starker Abfall. Die Ausreifungstendenz wurde auch anhand des Anstiegs des modifizierten Reifungsindex sichtbar (Abb. 18, S. 36).

3.2.4. Ansatz Nr. 8 (Zusatz von Leukopenie-Serum) Abbildung 16,17,18

Die Gesamtzellzahl zeigte einen doppelgipfligen Verlauf (Abb. 16, S. 35). Dem zweiten Anstieg zwischen 5. und 7. Tag entsprach ein Mitose-Index von 16,1 %. Auch hier fiel die monopoetische Reihe während des 1. Kulturtages stark ab, um ab 5. Tag bis zum Kulturende fast linear anzusteigen (Abb. 17, S. 35). Es traten wenig nekrobiotische Zellen auf. Der modifizierte Reifungsindex stieg am 1. Tag an (Abb. 18, S. 36) und blieb bei ca. 2,3 relativ konstant.

Bei den Ansätzen 5 und 8 und weniger ausgeprägt auch bei Ansatz 6 und 7 der Kulturreihe II war am 1. Tag ein starker Abfall der teilungsfähigen Zellen und dementsprechend ein Anstieg des modifizierten Reifungsindex zu beobachten (Abb. 18). Der Anteil der reifen Granulozyten stieg von ca 10 % auf 50 % innerhalb der ersten 24 Stunden und blieb bei allen 4 Ansätzen bis zum 5. Tag konstant. Nur in den Ansätzen mit definiertem Nährmedium und mit PWM-Überstand-Zusatz zeigte sich dann ein Abfall (Abb. 11,13; S. 32 u. 33), was auch aus der Übersicht der modifizierten Reifungsindices (Abb. 18 und Tab. 8, S. 61) hervorgeht.



Ansatz Nr. 5 (Kulturreihe I); CML-Knochenmark in RPMI
 absolute Granulozytenzahl (Abb. 10);
 Relativwerte aller Knochenmarkszellen (Abb. 11)

Zell-
zahl

Abbildung 12



Tage	0	1	3	5	7	10
C/E	21,7	348	-	-	-	-
w/I	10,1	7,7	0	3,0	2,2	14,7
%						

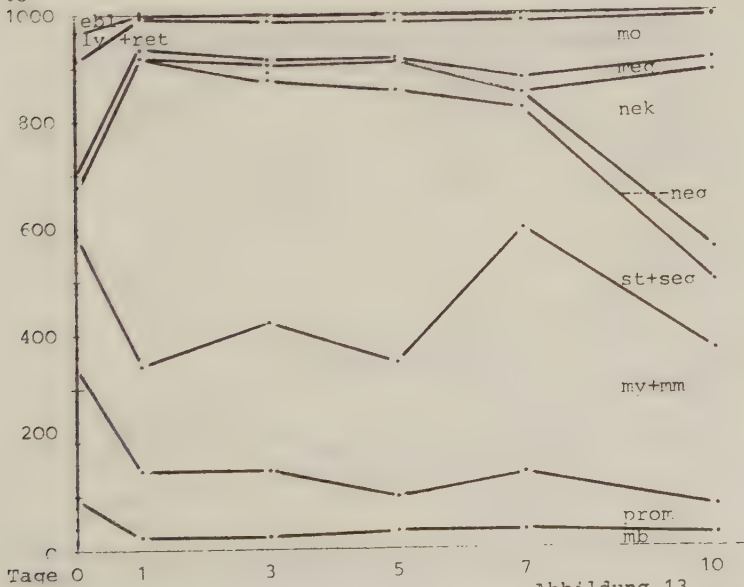
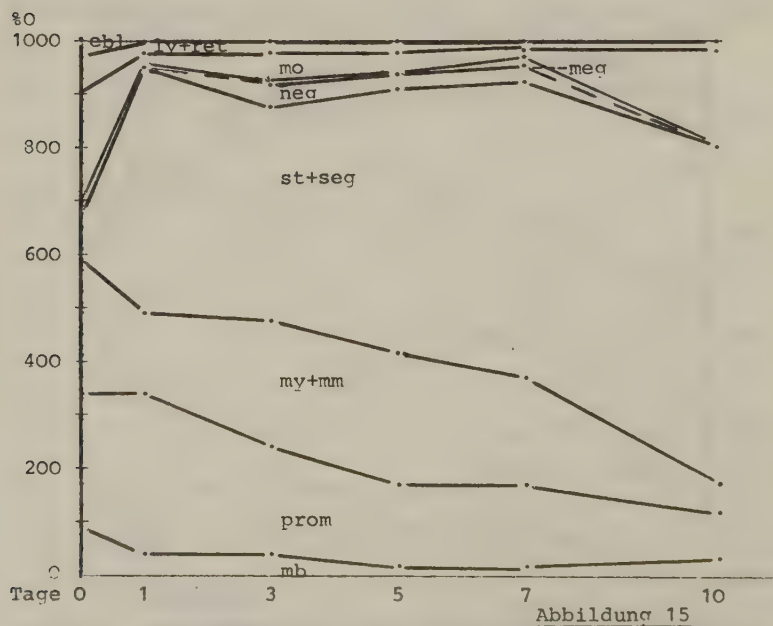
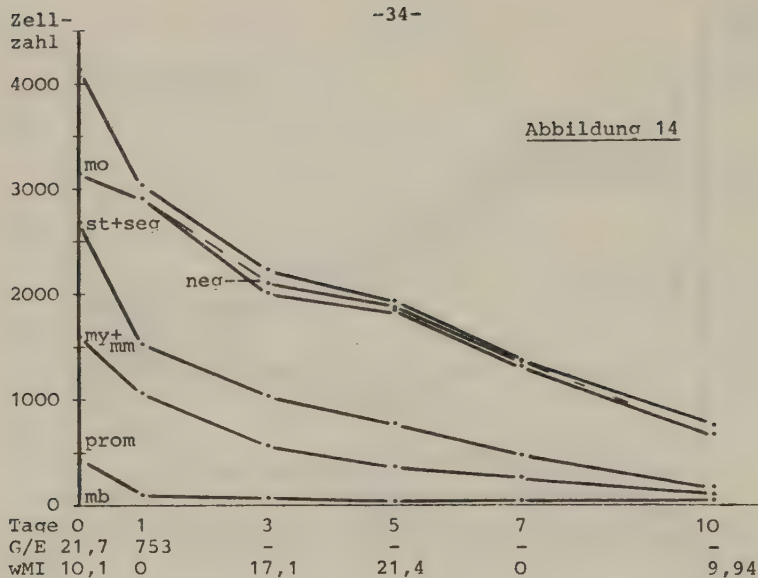
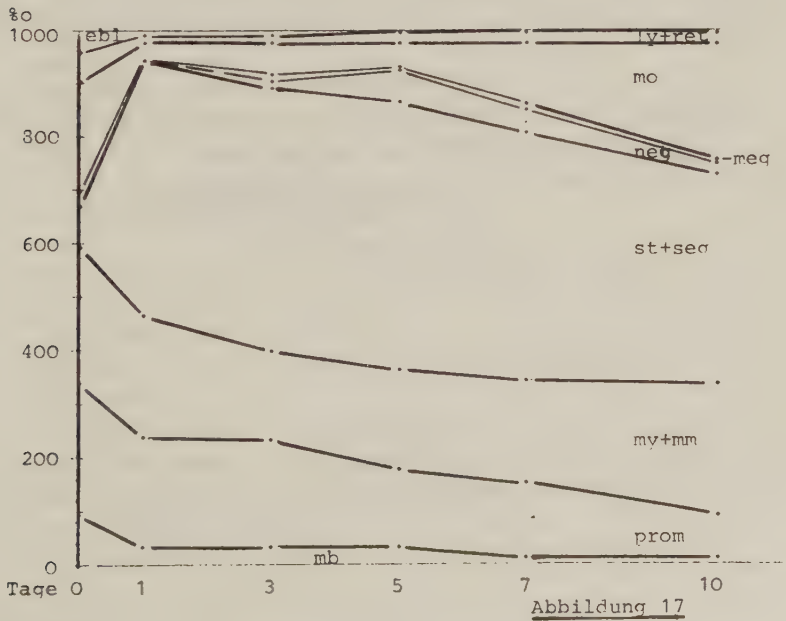
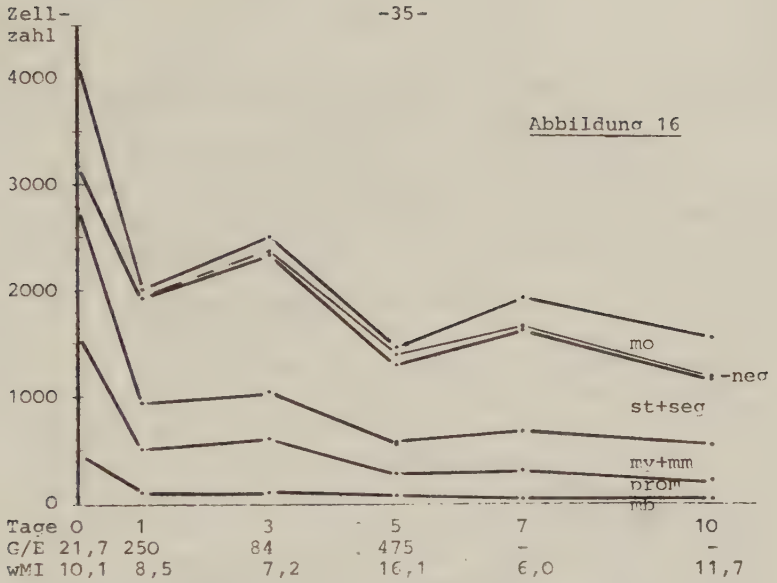


Abbildung 13

Ansatz Nr. 6 (Kulturreihe II); CML-Knochenmark in PWM-ÜST
absolute Granulozytenzahl (Abb. 12);
Relativwerte aller Knochenmarkzellen (Abb. 13)



Ansatz Nr. 7 (Kulturreihe II); CML-KM in CML-Fremdserum gef.
absolute Granulozytenzahl (Abb. 14);
Relativwerte aller Knochenmarkzellen (Abb. 15)



Ansatz Nr. 8 (Kulturreihe II); CML-KM in Leukopenie-Serum
 absolute Granulozytenzahl (Abb. 16);
 Relativwerte aller Knochenmarkzellen (Abb. 17)

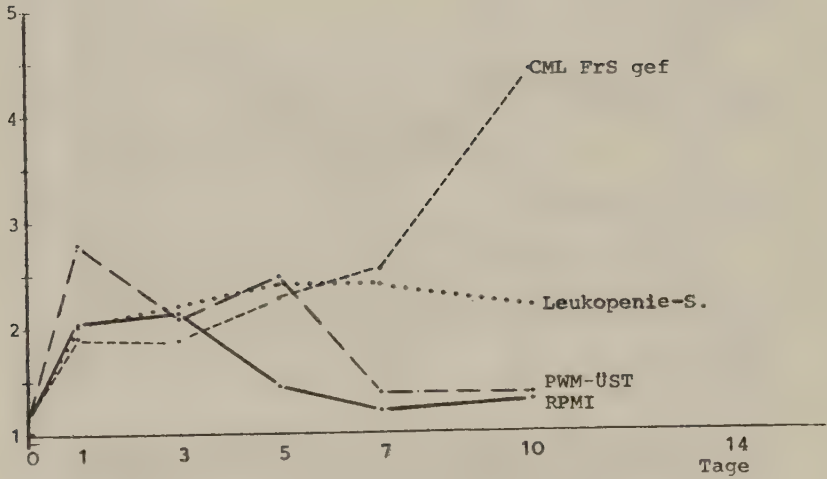


Abbildung 18

Granulopoetischer Reifungsindex (modif.)
Kulturreihe II (Pat. G.)

= $\frac{\text{Gesamtzahl der Granulopoese}}{\text{Granuloblasten (teilungsfähig)}}$
(Erläuterungen s.S. 11)

3.3. Kulturreihe III Knochenmark des Pat. B.H. K.,
nach FICOLL-Separation

Der Originalansatz enthielt 4.050 Zellen/ μ l.

Entsprechend der Ficoll-Separation lag der Anteil der Teilungsfähigen im Originalansatz über 75 % bei einem modifizierten Reifungsindex von 1,2 (Abb. 29, S. 45).

3.3.1. Ansatz Nr. 9 (ohne Zusätze)

Abbildung 19, 20, 29

Die Zellen konnten bis zum 7. Tag differenziert werden. Bis zum 2. Tag nahm die Gesamtzellzahl der Granulopoese etwas zu (Abb. 19, S. 39), wobei die Differentialverteilung konstant blieb (Abb. 20, S. 39).

Mit dem Abfall der Zellzahl und dem Auftreten von Nekrobiose und Nekrose fiel auch die Zahl der reifen Granulozyten und der Promyelozyten ab, während die Zahl der Myelo- und Metamyelozyten konstant blieb. Die Fraktion der Myeloblasten sank. Der Anteil der Monopoese blieb gering.

Der weiße Mitose-Index fiel von 15 %o rasch auf 3 %o am 2. und auf Null am 5. Tag ab (Tab. 2, S. 54).

Der granulopoetische Reifungskoeffizient hatte einen niedrigen Ausgangswert (1,2) und blieb etwa konstant (Abb. 29, S. 45).

3.3.2. Ansatz Nr. 10 (Zusatz von PWM-Überstand)

Abbildung 21, 22, 29

Dieser Ansatz ist dem RPMI-Ansatz (Nr. 9) sehr ähnlich. Der Anteil der monopoetischen Zellen nahm im Laufe der Kultur zu.

Die Prozentzahl der Immunoblasten war kleiner als 0,5 %. Beim modifizierten Reifungsindex zeigte sich ein Anstieg auf 1,5 bis zum 5. Tag, um dann wieder auf einen Wert von fast 1 abzufallen.

3.3.3. Ansatz Nr. 11 (Zusatz von frischem Eigenserum)

Abbildung 23,24,29

Die Stichproben konnten bis zum 9. Tag ausgewertet werden. Die Gesamtzellzahl der weißen Reihe blieb bis zum 2. Tag konstant und fiel auch dann nur sehr wenig ab, dabei zeigte sich ein hoher Anteil stab- und segmentkerniger Granulozyten, der in den letzten 7 Tagen noch weiter zunahm.

Die Monopoese war konstant niedrig.

Der Mitose-Index (15 ‰) blieb nur bis zum 2. Tag hoch.

Der Reifungsindex war in seinem Verlauf wie alle Werte dieser Kulturreihe niedrig.

3.3.4. Ansatz Nr. 12 (Zusatz von gefrorenem Eigenserum)

Abbildung 25,26,29

Die Zellzahl blieb hier bis zum 7. Tag über dem Ausgangswert. Der Verlauf der Differentialverteilungskurve (Abb. 26, S. 42) glich dem des Ansatzes Nr. 11, wobei hier aber eine Differenzierung bis zum 12. Tag möglich war.

Die Mitose-Indices waren mittelhoch.

3.3.5. Ansatz Nr. 13 (Zusatz von Leukopenie-Serum)

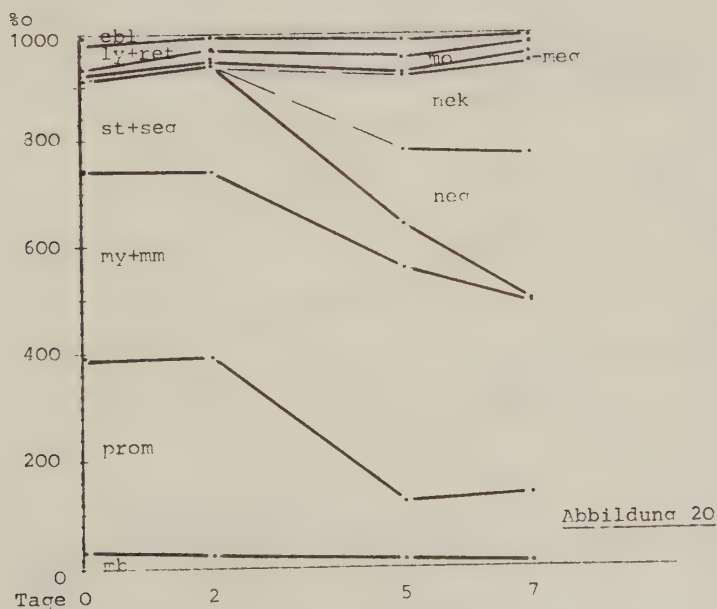
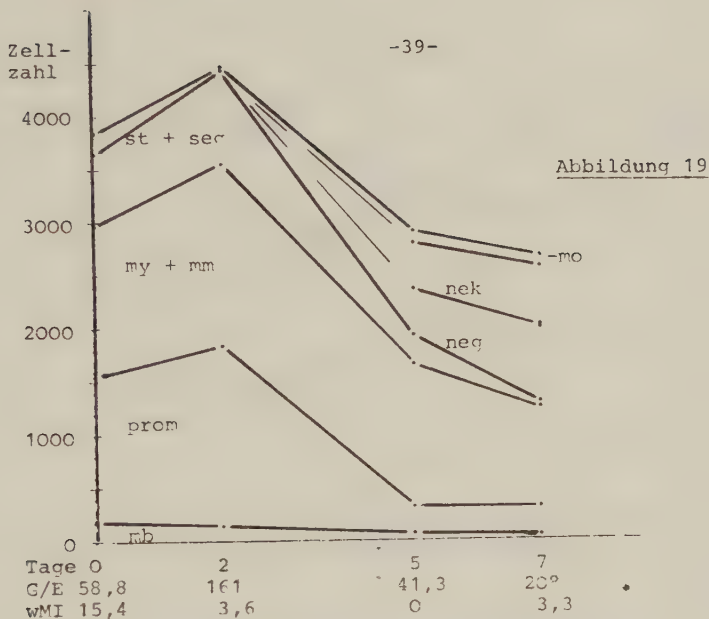
Abbildung 27,28,29

Bis zum 14. Tag war Zellwachstum zu beobachten.

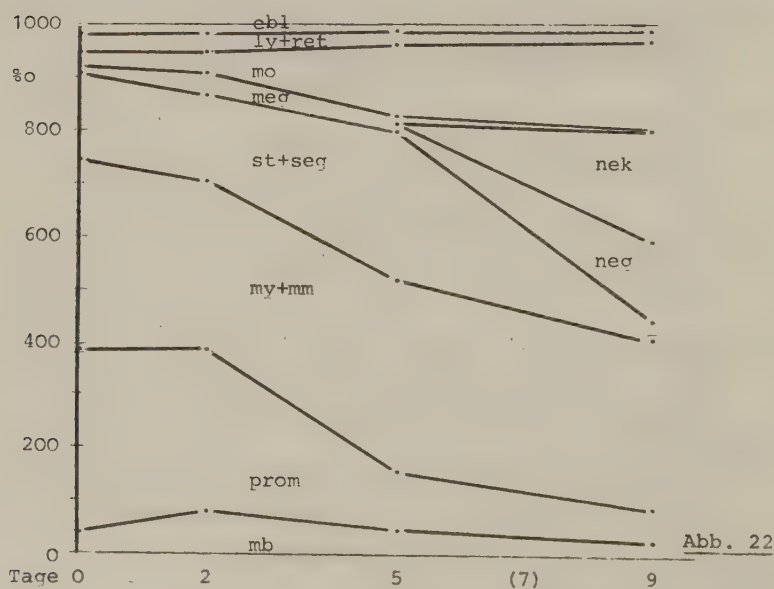
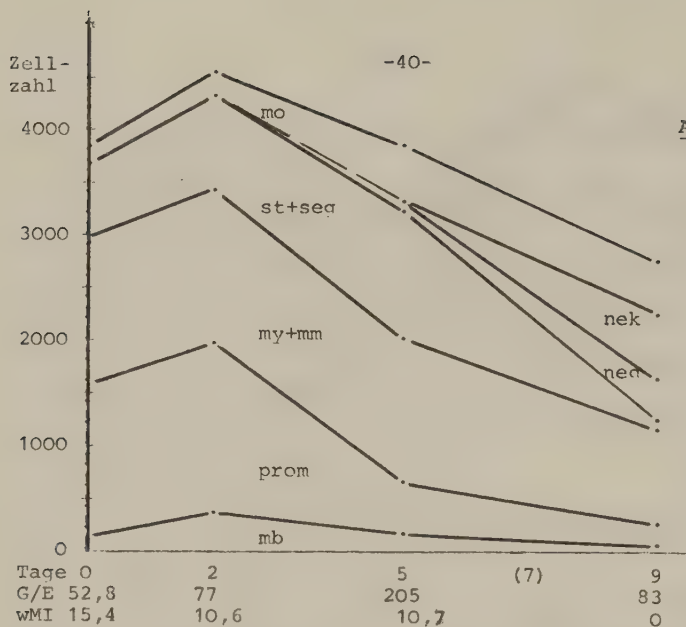
Die Reifungskurve (Abb. 27, S. 43) und auch die Mitose-Indices zeigten hier einen doppelgipfligen Verlauf mit Maxima am 5. und 9. Tag.

Die Differentialverteilungskurve (Abb. 28, S. 44) zeigte einen Myelo- und Metamyelozytenabfall am 7. Tag, genau entgegengesetzt verhielt sich die Population der reifen Granulozyten.

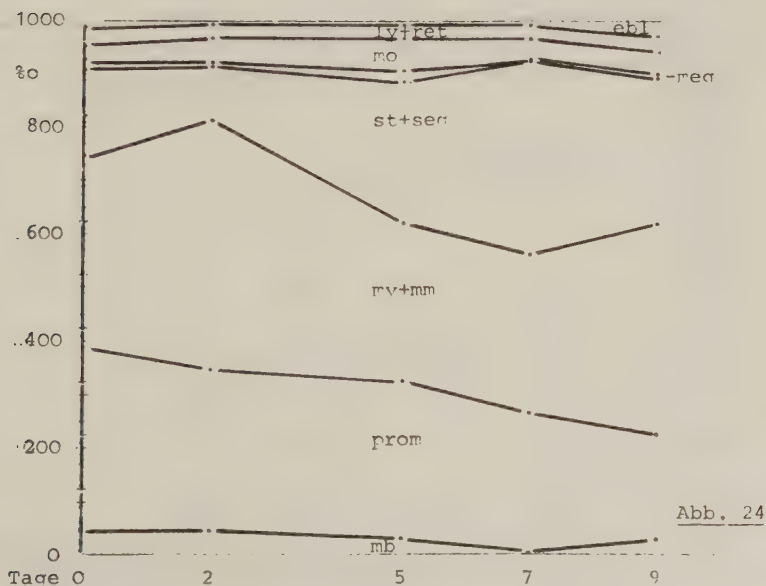
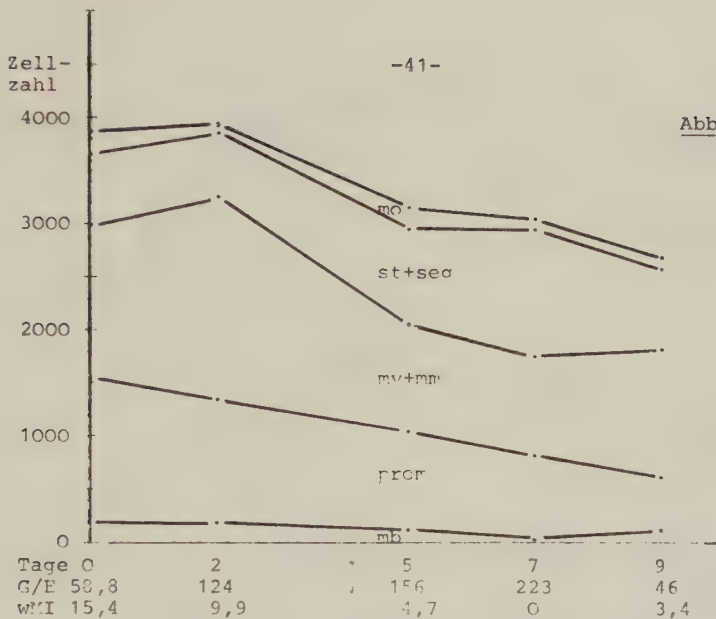
Der bei allen Ansätzen dieser Kulturreihe beobachtete Abfall des wMI zeigte sich hier erst nach dem 9. Tag.



Ansatz Nr. 9 (Kulturreihe III); CML-Knochenmark in RPMI
 absolute Granulozytenzahl (Abb. 19);
 Relativwerte aller Knochenmarkzellen (Abb. 20)

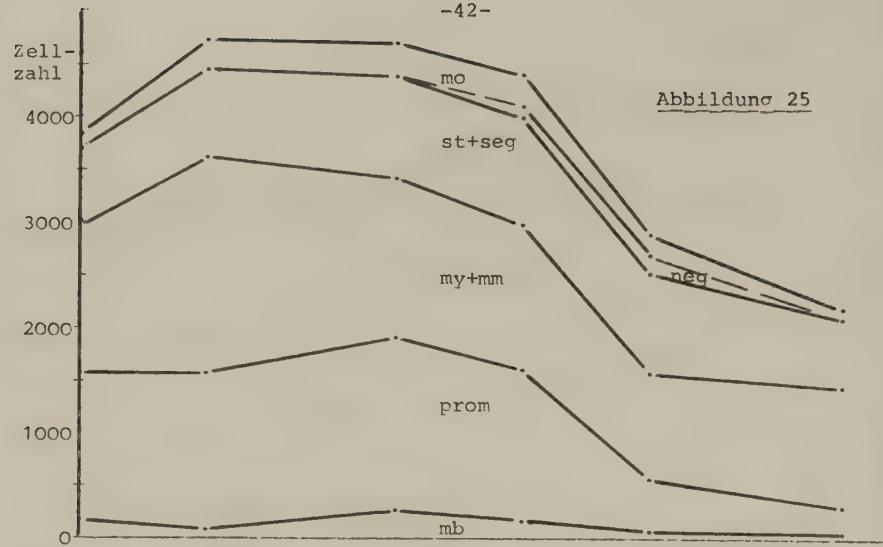


Ansatz Nr. 10 (Kulturreihe III); CML-KM in PWM-ÜST
 absolute Granulozytenzahl (Abb. 21);
 Relativwerte aller Knochenmarkzellen (Abb. 22)



Ansatz Nr. 11 (Kulturreihe III);
 CML-Knochenmark in frischem Eigenserum;
 absolute Granulozytenzahl (Abb. 23);
 Relativwerte aller Knochenmarkzellen (Abb. 24)

Abbildung 25



Tage	0	2	5	7	9	12
G/E	58,8	-	172	-	-	-
wMI	15,4	7,4	8,3	4,9	0	0



Abbildung 26

Ansatz Nr. 12 (Kulturreihe III); CML-KM in gefr. Eigenserum
absolute Granulozytenzahl (Abb. 25);
Relativwerte aller Knochenmarkszellen (Abb. 26)

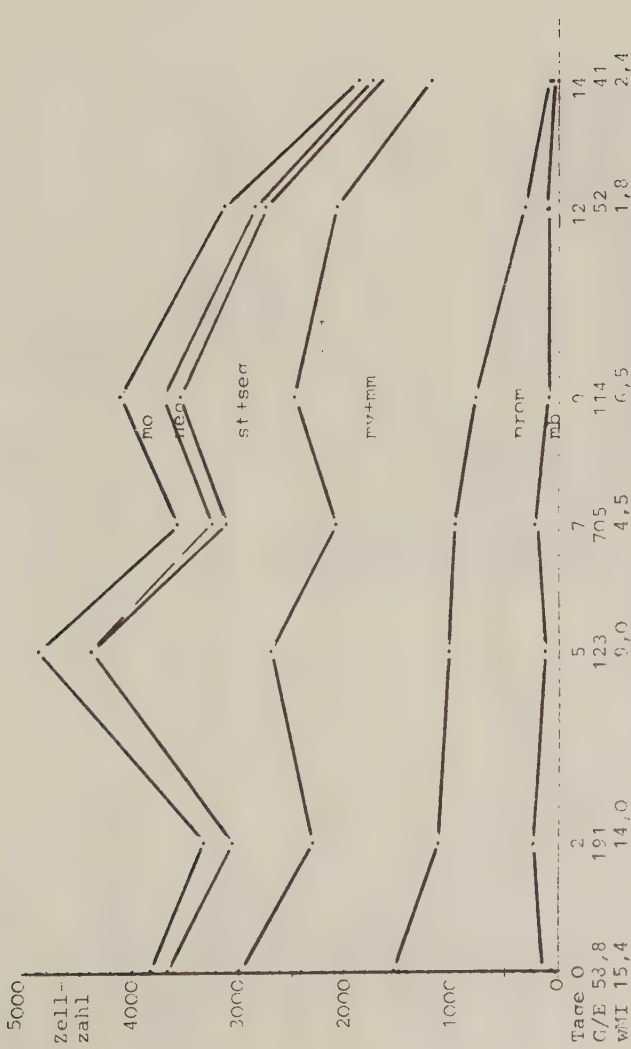
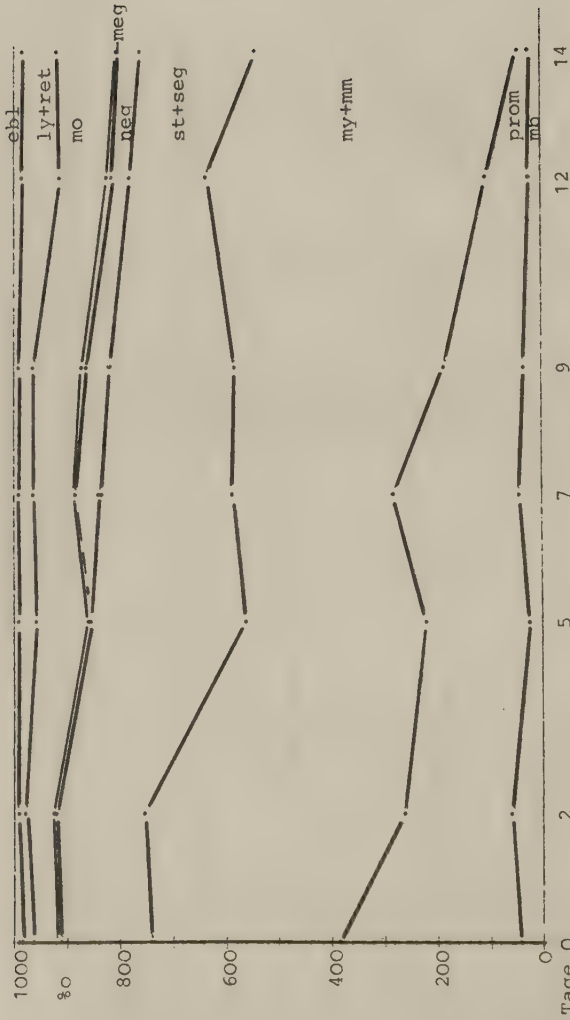


Abbildung 27



Reifungskurven des Ansatzes Nr. 13 (Kulturreihe III)
CML-Knochenmark in Leukopenie-Serum
Relativwerte aller Knochenmarkszellen

Abbildung 28

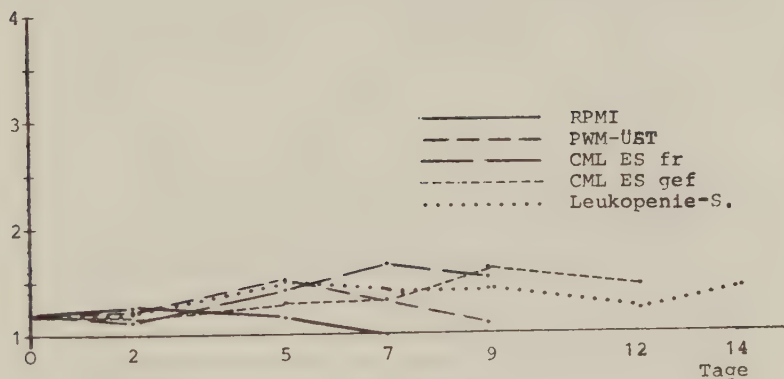


Abbildung 29

Granulopoetischer Reifungsindex
Kulturreihe III (Pat. K.) n. FICOLL-Sep.

= $\frac{\text{Gesamtzahl der Granulopoese}}{\text{Granuloblasten (teilungsfähig)}}$

3.4. Kulturreihe IV (Knochenmark des Pat. E.Z.,
nach FICOLL-Separation)

Der Originalansatz enthielt 2.700 Zellen/ μ l.
Entsprechend der Ficoll-Separation war der Anteil der
Teilungsfähigen im Originalansatz mit ca. 60 % (ent-
sprechend einem Reifungsindex von 1,4) relativ hoch.

3.4.1. Ansatz Nr. 14 (ohne Zusätze)

Abbildung 30, 31, 36

Bis zum 7. Tag war eine Differenzierung möglich.
Die Gesamtzahl der Zellen der Granulopoese nahm bis zum
2. Tag zugunsten vor allem der Myelozyten und Metamyelo-
zyten zu, während die Promyelozyten abfielen (Abb. 30,
S. 48). In der Differentialverteilungskurve fiel der
wachsende Anteil der Myelozyten und Metamyelozyten (am 7.
Tag 70 %) auf Kosten der Stab- und Segmentkernigen (am 7.
Tag 5 %) ins Auge. Mit Abfall der reifen Granulozyten
traten auch hier nekrotische Zellen auf.
Die monopoetische Reihe fiel kontinuierlich ab (Abb. 31,
S. 48). Mit zunehmender Kulturdauer wurden weniger
Mitosen gesehen (Ausgangswert 8 ‰).
Der modifizierte Reifungsindex (GZ/GBL-I) stieg am 4. Tag
gering an, fiel dann aber wieder ab.

3.4.2. Ansatz 15 (Zusatz von frischem Eigenserum)

Abbildung 32, 33, 36

Die Gesamtzellzahl der Granulopoese stieg bis zum 4.
Tag stark an, ab 2. Tag zugunsten der reifen Granulozyten
bei gleichzeitigem Abfall der unreifen Formen. In der
Differentialverteilungskurve (Abb. 33, S. 49) beobachtete
man bis zum 2. Tag einen Abfall des Anteils an reifen
Granulozyten, der sich dann aber bis zum 4. Tag auf 60 %
erhöhte, am 7. Tag 33 % betrug und am 11. Tag bei 45 % lag.
Die Erythropoese zeigte einen ungewöhnlich hohen Anteil
mit 10 % am 2. Tag.

Die Zellen der Monopoese verringerten sich im Laufe der Kulturdauer geringfügig (5 %).

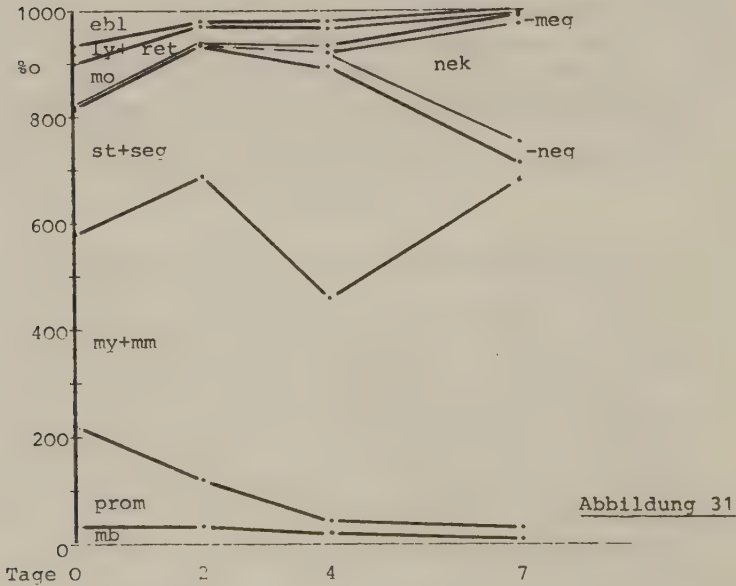
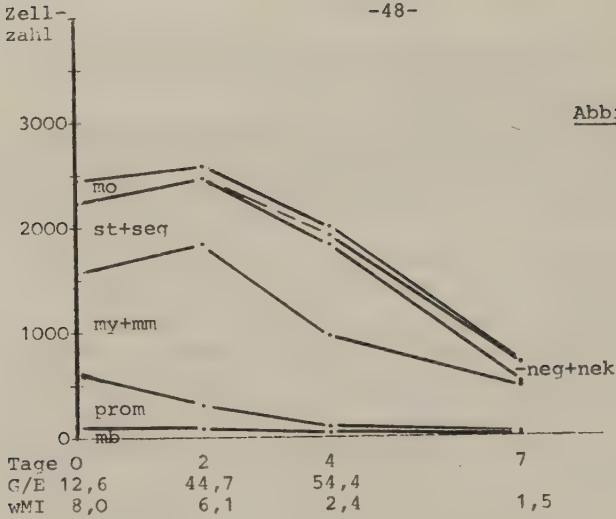
Entsprechend der Differentialverteilung kam es nach dem 2. und 7. Tag jeweils zu einem starken Anstieg des granulopoetischen Reifungsindex (Abb. 36, S. 52).

3.4.3. Ansatz Nr. 16 (Zusatz von gefrorenem Eigenserum)

Abbildung 34, 35, 36

Ein Wachstum der Knochenmarkzellen in der Kultur konnte bis zum 15. Tag beobachtet werden. Auch hier zeigte sich wie bei Ansatz Nr. 15 (Zusatz von frischem Eigenserum) am 4. Tag eine Zunahme der Zellzahl, besonders der stab- und segmentkernigen Granulozyten. Sowohl Reifungskurven, Differentialverteilungskurven als auch die modifizierten GZ/GBI-Indices glichen auffällig denen des Ansatzes Nr. 15 (Abb. 36, S. 52).

Die Mitose-Indices waren am 2. Tag viel höher als bei Zusatz von frischem Eigenserum (Ansatz 15), am 4. und 7. Tag etwa gleich hoch, danach zeigten sich entsprechend der längeren Proliferationsdauer wieder höhere Werte (Tab. 2, S. 54).



Ansatz Nr. 14 (Kulturreihe IV); CML-Knochenmark in RPMI
absolute Granulozytenzahl (Abb. 30);
Relativwerte aller Knochenmarkszellen (Abb. 31)

Abbildung 32

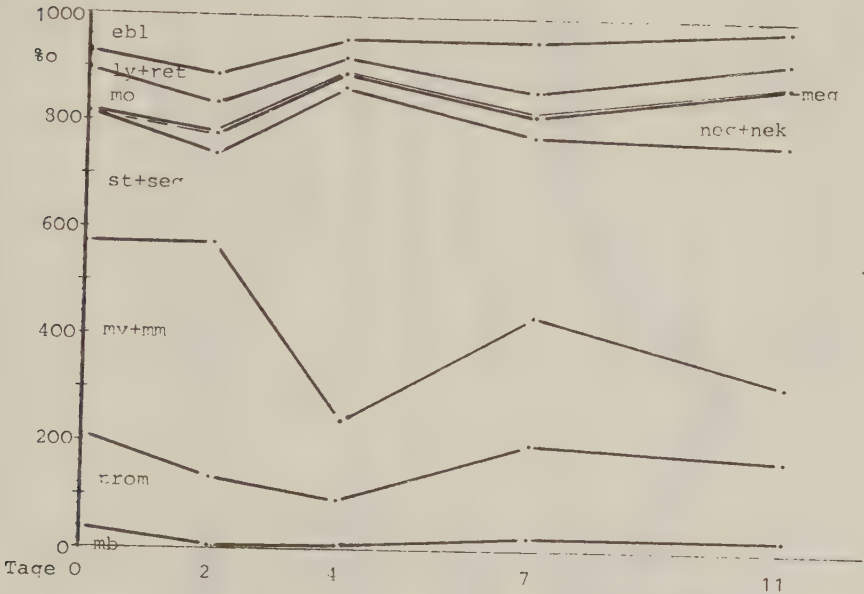
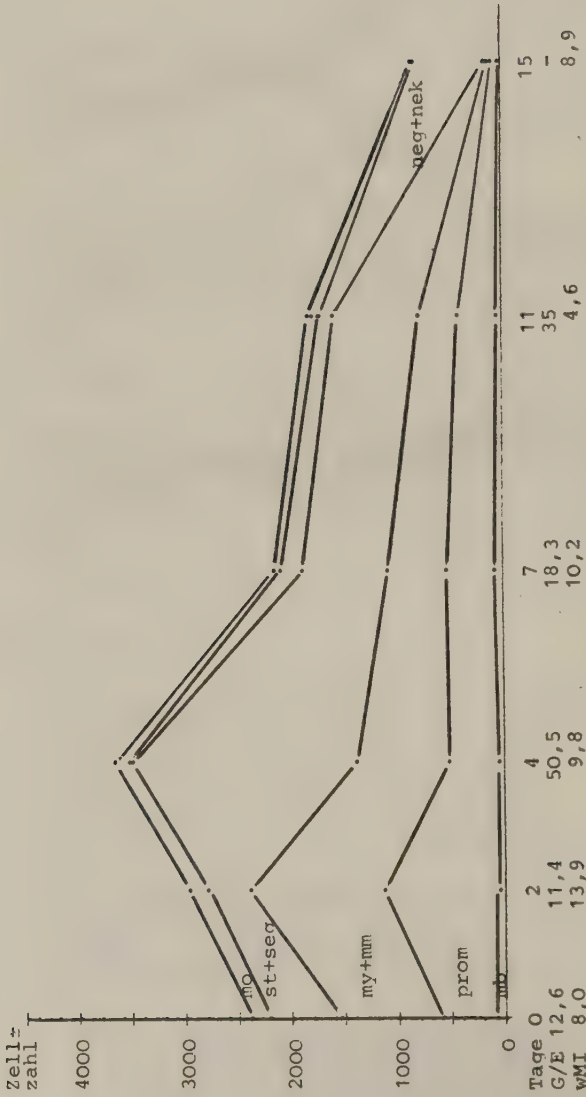


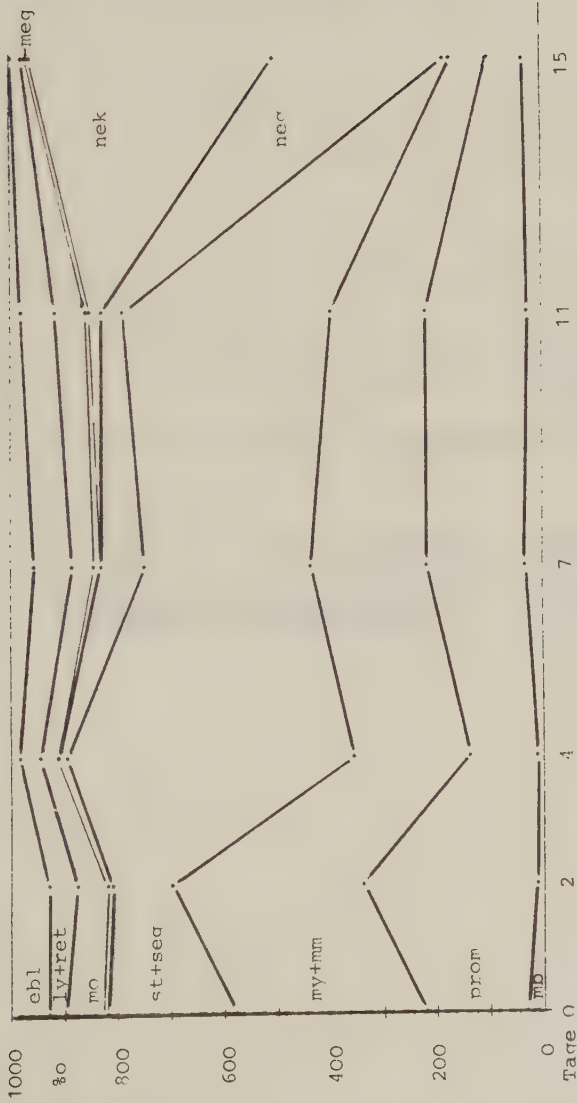
Abbildung 33

Ansatz Nr. 15 (Kulturreihe IV);
 CML-Knochenmark in CML-Serum (Eigenserum, frisch)
 absolute Granulozytenzahl (Abb. 32);
 Relativwerte aller Knochenmarkzellen (Abb. 33)



Reifungskurven des Ansatzes Nr. 16 (Kulturreihe IV)
CML-Knochenmark in CML-Serum (Eigens Serum gefr.)
absolute Granulozytenzahl

Abbildung 34



Reifungskurven des Ansatzes Nr. 16 (Kulturreihe IV)
CML-Knochenmark in CML-Serum (Eigensum gefr.)
Relativwerte aller Knochenmarkzellen

Abbildung 35

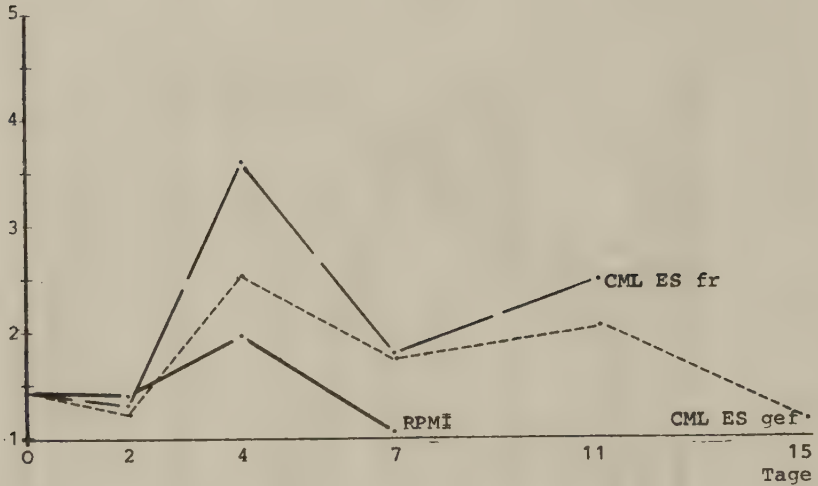


Abbildung 36

Granulopoetischer Reifungsindex (modif.)
Kulturreihe IV (Pat. Z.) nach FICOLL-Sep.
(= $\frac{\text{Gesamtzahl der Granulopoese}}{\text{Granuloblasten (teilungsfähig)}}$)

3.5. Die weißen MITOSE-INDICES (wMI)

Das Verhalten der wMI wurde im einzelnen schon mit den Ergebnissen der Kulturreihen I bis IV (Kap. 3.1. - 3.4.) beschrieben.

Betrachtet man die Übersicht der weißen Mitose-Indices (Tab. 2, S. 54), so fallen überdurchschnittlich hohe Werte (17 - 21 %) in den Ansätzen mit Zusatz von gefrorenen CML-Seren auf.

In den Ansätzen ohne Serumzusatz waren in allen vier Kulturreihen Zellteilungen vorhanden. In Reihe II zeigte sich ein rascher Abfall auf niedrige Werte.

In Kulturreihe I konnte für PWM-ÜST eine bis zum letzten Kulturtag zu verfolgende hohe Mitoserate beobachtet werden, die über den Werten der anderen Ansätze dieser Reihe lag.

In Kulturreihe III (nach Ficoll-Separation) war ein vergleichsweise langsamer Abfall des wMI in der Serie mit Leukopenie-Serum-Zusatz erkennbar.

In Kulturreihe IV (nach Ficoll-Separation) errechneten sich nach Zusatz von gefrorenem Eigenserum mittlere und hohe, einen doppelgipfligen Verlauf ergebende Mitose-Indices.

Tabelle 2 Übersicht der weißen Mitose-Indices

<u>Kulturreihe I</u>							
Kulturtage	0	2	4	6	8	11	16
<u>RPMI</u>	8,7	4,2	6,9	4,8	7,1	0	-
<u>PWM-ÜST</u>		12,9	6,2	6,3	12,8	10,9	6,3
<u>CML ES fr</u>		6,4	5,5	3,1	4,1	1,9	4,6
<u>Leukop.-S.</u>		4,9	5,9	9,6	8,3	6,4	(14,3) ⁺

<u>Kulturreihe II</u>							
Kulturtage	0	1	3	5	7	10	14
<u>RPMI</u>	10,12	0	12,95	10,3	8,92	0	-
<u>PWM-ÜST</u>		7,67	0	3,0	2,2	14,7	-
<u>CML FrS gef</u>		0	17,1	21,4	0	9,94	-
<u>Leukop.-S.</u>		8,5	7,2	16,1	6,0	11,7	-

<u>Kulturreihe III</u> (nach FICOLL-Separation)							
Kulturtage	0	2	5	7	9	12	14
<u>RPMI</u>	15,4	3,6	0	3,3	-	-	-
<u>PWM-ÜST</u>		10,6	10,7	-	0	-	-
<u>CML ES fr</u>		9,85	4,7	0	3,4	-	-
<u>CML ES gef</u>		7,4	8,3	4,87	0	0	-
<u>Leukop.-S.</u>		14,04	9,04	4,47	6,48	1,8	2,4

<u>Kulturreihe IV</u> (nach FICOLL-Separation)							
Kulturtage	0	2	4	7	11	15	
<u>RPMI</u>	8,03	6,05	2,4	1,48	-	-	
<u>CML ES fr</u>		4,9	10,5	9,5	0	-	
<u>CML ES gef</u>		13,95	9,8	20,2	4,6	8,95	

Anmerkung +: 3/4 Promonozytenteilungen

3.5.1. Vergleich der wMI nach Zusatz von frischem und gefrorenem CML-Eigensserum (Signifikanzberechnung)

Aus den Kulturreihen III und IV (nach Ficoll-Separation) wurden die wMI der Ansätze mit frischem und gefrorenem CML-Eigensserum-Zusatz vergleichend auf Signifikanz berechnet. Die tatsächlich gezählten Mitosen und Teilungsfähigen jeder einzelnen Stichprobe (hier wurden jeweils 2.000 Zellen ausgewertet) wurden zugrunde gelegt.

Tabelle 3

Signifikanzberechnung der wMI aus Kulturreihe III

<u>Ansatz 11</u>	<u>(CML ES fr)</u>					
Kulturtag	0	2	5	7	9	11
wMI (%)	15,4	9,85	4,7	0	3,4	-
M _O	23	16	6	0	4	-
N _O	1471	1608	1271	1135	1172	-
<u>Ansatz 12</u>	<u>(CML ES gef)</u>					
wMI (%)		7,4	8,3	4,87	0	0
M _O		11	11	3	0	0
N _O		1475	1314	613	1074	1320
χ^2		0,54	1,3	<u>3,055</u>	<u>1,99</u>	-
p		>0,3	>0,2	>0,05	>0,1	
S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Es errechnet sich keine Signifikanz bei den beobachteten Mitosen.

(Abkürzungen s.S. 12; die unterstrichenen Werte sind nach Yates korrigiert.)

Tabelle 4

Signifikanzberechnung der wMI aus Kulturreihe IV

Ansatz 15		(CML ES fr)				
Kulturtag	0	2	4	7	11	15
wMI (‰)	8,03	4,9	10,5	9,5	0	-
M _O	10	6	5	8	0	-
N _O	1235	1219	471	837	639	-
Ansatz 16		(CML ES gef)				
wMI (‰)		13,95	9,8	20,2	4,6	8,95
M _O		20	7	18	4	3
N _O		1414	707	873	866	335
χ^2		5,57	0,032	3,38	<u>2,54</u>	-
P		>0,01	>0,8	>0,05	>0,1	
S		s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Nur am 2. Tag zeigte sich ein statistisch gesicherter Unterschied.

(Abkürzungen s.S. 12; der unterstrichene Wert ist nach Yates korrigiert.)

Der Vergleich der Summe aller Mitosen (gefrorenes Eigensserum gegen frisches Eigensserum) zeigte nur am 7. - 9. Tag eine schwach signifikante Vermehrung der Mitosen der Ansätze mit gefrorenem CML-Eigensserum-Zusatz ($\chi^2 = 4,66$; $0,05 > p > 0,02$).

3.5.2. Mittelwerte der weißen Mitose-Indices ($\overline{wMI}$)

Die wMI der einzelnen Ansätze wurden nicht einfach gemittelt, sondern alle in den Kulturen mit definiertem Zusatz beobachteten Mitosen wurden auf die Summe aller Teilungsfähigen bezogen. Da nicht jede der vier Kultur-reihen den gleichen Zusatz erhielt, und außerdem die Stichprobenentnahmen für die einzelnen Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgten, liegt der Berechnung der Mittelwerte jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Ansätzen zugrunde. (In Tab. 5 erscheint diese Anzahl als Apposition.) Für die einzelnen Serumzusätze ergibt sich deshalb ein Unterschied der $\overline{wMI}$ in den Originalansätzen.

Tabelle 5 $\overline{wMI}$ (Zusammenfassung nach Serum-Zusätzen)

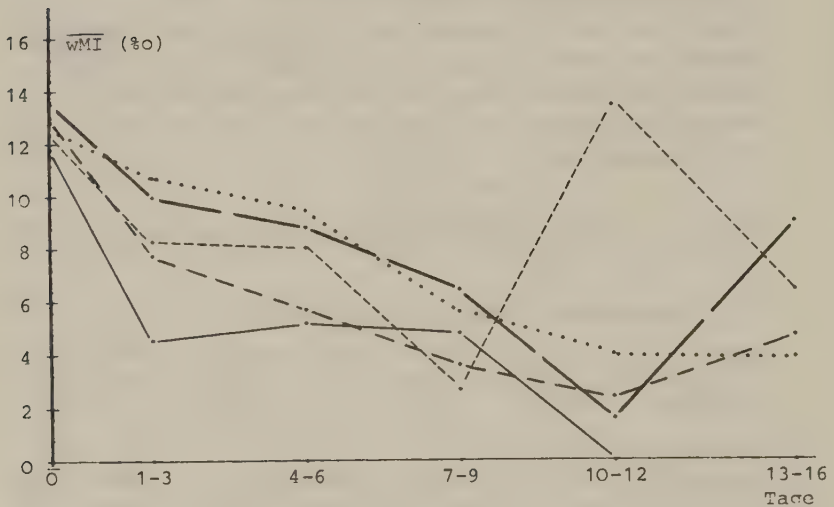
Tage	0	1-3	4-6	7-9	10-12	13-16
<u>RPMI</u>	11,92 ⁴	4,54 ⁵	5,3 ⁵	4,85 ⁴	0 ²	-
<u>PWM-ÜST</u>	12,84 ³	8,24 ⁴	8,02 ⁴	2,65 ³	13,3 ²	6,3 ¹
<u>CML ES fr</u>	13,1 ³	7,76 ³	5,8 ⁴	3,64 ⁴	2,48 ²	4,7 ¹
<u>CML ES gef</u>	13,63 ²	10,02 ²	8,75 ²	6,49 ³	1,66 ²	8,89 ¹
<u>Leukop.-S.</u>	12,84 ³	10,7 ⁴	9,48 ⁴	5,66 ⁴	4,04 ³	3,84 ²

Bei der vergleichenden Betrachtung der Mittelwerte der wMI für die verschiedenen Zusätze (Tab. 5, Abb. 37) fällt folgendes ins Auge: Im RPMI-Medium zeigten sich die niedrigsten $\overline{wMI}$; Zusatz von CML-Eigenserum (gefr.) und Leukopenie-Serum ergaben die höchsten Werte. Im Laufe der Kultur kam es zu einem Abfall, gegen Ende jedoch zu einem uneinheitlichen Anstieg der $\overline{wMI}$.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß bei der geringen Anzahl beobachteter Mitosen (CML!) die Variabilität

der Ergebnisse zunahm (s. Undritz S. 41; 72); außerdem waren bei Ansatz 4 am 16. Tag drei von vier Mitosen Promonozytenteilungen (Tab. 2).

Abbildung 37 Mittelwerte der weißen Mitose-Indices
(nach Tabelle 5)



Zeichenerklärung: — RPMI
----- PWM-Überstand
- · - · - CML-Eigenserum frisch
———— CML-Eigenserum gefroren
..... Leukopenie-Serum

3.5.3. Vergleich der Mittelwerte der wMI

Aus den vorliegenden Mittelwerten der wMI (Tab. 5, S. 57) wurde eine statistische Auswertung für die einzelnen Serumzusätze in Gegenüberstellung mit RPMI vorgenommen.

Tabelle 6 (Signifikanzberechnung der wMI gegen RPMI)

a)	<u>Pokeweed-Mitogen-Überstand</u>			
Kulturtage	1-3	4-6	7-9	10-12
x^2	10,09	2,8	1,8	4,7
p	$0,01 > p > 0,001$	$0,1 > p > 0,05$	$0,2 > p > 0,1$	$0,05 > p > 0,025$
S	h.s.	n.s.	n.s.	schw.s.

Nur am 1. - 3. Tag war eine eindeutige Signifikanz zu sehen.

b)	<u>CML-Eigenserum frisch</u>			
Kulturtage	1-3	4-6	7-9	10-12
x^2	6,5	0,114	0,73	1,12
p	$0,02 > p > 0,01$	$p > 0,7$	$p > 0,3$	$p > 0,1$
S	s.	n.s.	n.s.	n.s.

Am 1. - 3. Tag errechnete sich eine Signifikanz.

c)	<u>CML-Eigenserum gefroren</u>			
Kulturtage	1-3	4-6	7-9	10-12
x^2	17,4	4,4	0,81	0,032
p	$p < 0,001$	$0,05 > p > 0,025$	$p > 0,3$	$p > 0,7$
S	h.s.	schw.s.	n.s.	n.s.

Am 1.-3. Tag zeigten sich hoch signifikante und am 4.-6. Tag nur signifikante Unterschiede zwischen RPMI und CML-Eigenserum (gefr.). Zum Vergleich CML-ES frisch gegen gefroren siehe S. 55 und 56.

d)	<u>Leukopenie-Serum</u>			
Kulturtage	1-3	4-6	7-9	10-12
x^2	21,4	5,96	0,221	0,84
p	$p < 0,001$	$0,02 > p > 0,01$	$p > 0,5$	$p > 0,3$
S	h.s.	s.	n.s.	n.s.

Am Kulturbeginn zeigte sich eine hohe Signifikanz, während

am 4.-6. Tag nur noch statistisch gesicherte Unterschiede (1-2 %) zu der Anzahl der RPMI-Mitosen nachweisbar waren.

(Abkürzungen in Tab. 6 s. Seite 12)

3.6. Der modifizierte Reifungsindex

Der Quotient Gesamtzahl der Granulozyten zu teilungsfähigen Zellen der Granulopoese scheint die Ausreifungstendenz gut zu veranschaulichen. (Siehe auch Seite 11.)

Bei der Gesamtbetrachtung sämtlicher Ausreifungsindices (Abb. S. 62 und 63) beobachtet man, daß in allen vier Kulturreihen die Ausreifungstendenz der Ansätze mit CML- und Leukopenie-Serum deutlich über der von Ansätzen mit PWM-ÜST bzw. ohne Zusätze lag.

Darüber hinaus zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit von dem verwendeten Knochenmarkmaterial.

Bei einer Ausgangszellzahl von 4.050/ μ l zeigte sich in der Kulturreihe III (mit FICOLL-Separation) in allen Ansätzen eine geringere Ausreifungstendenz als in Kulturreihe IV (ebenfalls mit FICOLL-Separation), die eine Ausgangszellzahl von 2.700/ μ l hatte. Ohne Ficoll-Separation reifte die Granulopoese besser aus, dabei zeigten CML-Serum- und Leukopenie-Serumzusatz eine höhere Reifungstendenz als PWM-Überstand und RPMI.

Tabelle 7 Mittelwerte der modifizierten Reifungsindices
(Berechnungsverfahren wie in Tab. 5, S. 56)

Kulturstage	0	1-3	4-6	7-9	10-12	13-16
<u>RPMI</u>	1,32	1,52	1,68	1,19	1,31	-
<u>PWM-ÜST</u>	1,29	1,72	1,94	1,26	1,36	1,46
<u>CML ES fr</u>	1,42	1,32	2,29	1,71	2,72	5,19
<u>CML ES gef</u>	1,29	1,09	1,64	1,5	1,65	1,09
<u>Leukop.-S.</u>	1,29	1,67	2,01	1,68	1,63	1,53

Tabelle 8 Übersicht der modifizierten Reifungsindices

Kulturtage	<u>Kulturreihe I</u>						
	O	2	4	6	8	11	16
<u>RPMI</u>	2,48	1,73	1,94	2,52	1,9	1,33	-
<u>PWM-ÜST</u>		1,78	2,39	2,04	1,33	1,4	1,46
<u>CML ES fr</u>		1,98	2,74	1,54	3,31	3,2	5,19
<u>Leukop.-S.</u>		2,29	3,34	2,69	4,3	3,7	2,6

	<u>Kulturreihe II</u>						
Kulturtage	0	1	3	5	7	10	14
<u>RPMI</u>	1,14	2,04	2,12	1,45	1,18	1,28	-
<u>PWM-ÜST</u>		2,76	2,1	2,49	1,4	1,35	-
<u>CML FrS gef</u>		1,9	1,86	2,27	2,54	4,44	-
<u>Leukop.-S.</u>		2,03	2,25	2,4	2,44	2,2	-

Kulturtage	<u>Kulturreihe III (nach Ficoll-Separation)</u>						
	O	2	5	7	9	12	14
<u>RPMI</u>	1,23	1,26	1,16	1,01	-	-	-
<u>PWM-ÜST</u>		1,23	1,54	-	1,075	-	-
<u>CML ES fr</u>		1,13	1,42	1,66	1,44	-	-
<u>CML ES gef</u>		1,24	1,29	1,34	1,63	1,46	-
<u>Leukop.-S.</u>		1,22	1,53	1,45	1,44	1,24	1,43

Kulturtage	<u>Kulturreihe IV (nach Ficoll-Separation)</u>					
	O	2	4	7	11	15
<u>RPMI</u>	1,42	1,38	1,94	1,05	-	-
<u>CML ES fr</u>		1,29	3,58	1,77	2,43	-
<u>CML ES gef</u>		1,17	2,52	1,71	1,98	1,09

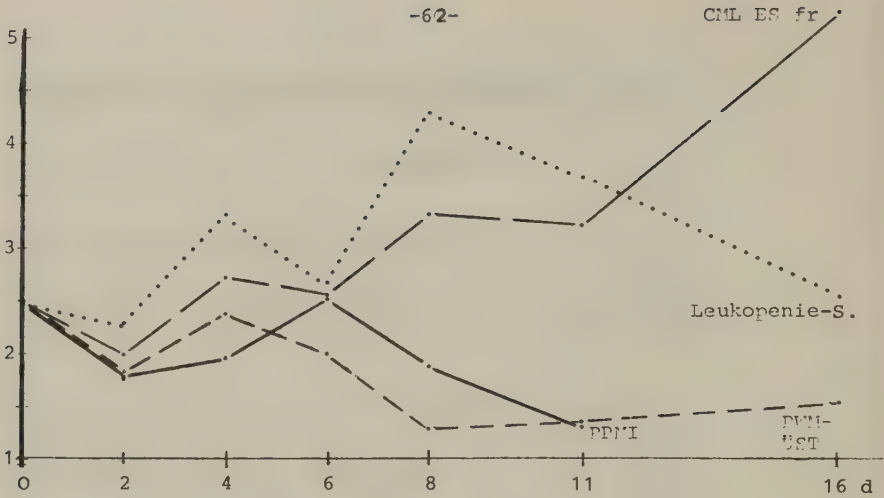


Abbildung 38 Modifizierter Reifungsindex
Kulturreihe I
= Gesamtzahl der Granulopoese
Granuloblasten (teilungsfähig)

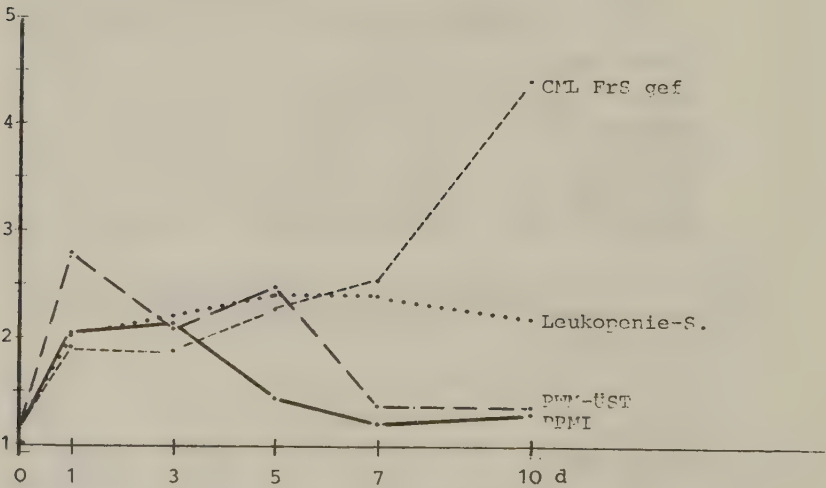


Abbildung 39 Modifizierter Reifungsindex
Kulturreihe II
= Gesamtzahl der Granulopoese
Granuloblasten (teilungsfähig)

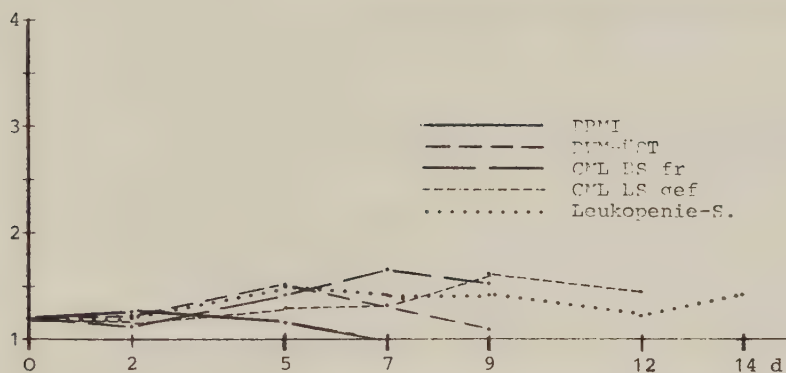


Abbildung 40 Modifizierter Reifungsindex
Kulturreihe III
= $\frac{\text{Gesamtzahl der Granulopoese}}{\text{Granuloblasten (teilungsfähig)}}$

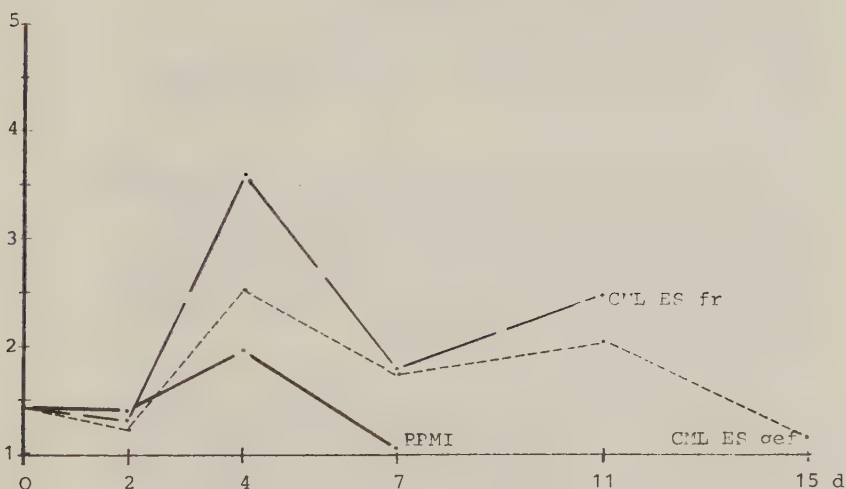


Abbildung 41 Modifizierter Reifungsindex
Kulturreihe IV
= $\frac{\text{Gesamtzahl der Granulopoese}}{\text{Granuloblasten (teilungsfähig)}}$

3.7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

a) Es wurde gezeigt, daß unter den gewählten Bedingungen (Zellsuspension ohne Mediumwechsel) Knochenmarkkulturen angelegt werden können, die bis zum 16. Tag zu differenzieren sind.

b) CML-Knochenmarkkulturen proliferieren stärker als Knochenmarkkulturen Gesunder (Schnurrbusch; 66), obwohl der Mitose-Index schon der Ausgangskulturen (0 h) deutlich geringer war (durchschnittlich 11,92 % in diesen Untersuchungen statt 13 % bei Gesunden; Tab. 2, S. 54).

c) Myeloblasten ließen sich in jedem Ansatz bis zum Kulturende nachweisen.

d) Da bei einer Lebensdauer der reifen Granulozyten von 48 - 60 Stunden alle später nachgewiesenen reifen Zellen in der Kultur selbst entstanden sein müssen, zeigte sich in diesen Untersuchungen kein Reifungsstopp der Granulopoese, denn immer waren Granulozyten bis zuletzt nachweisbar.

e) Die Ausreifungstendenz der Ansätze mit Ficoll-Separation war eindeutig geringer als die der Ansätze ohne, was auch besonders für die Monopoese galt, obwohl hier die Ausgangswerte (0 h) keine grundsätzlichen Unterschiede aufwiesen. Die Zahl der Makrophagen war um 80 % geringer als in den Kulturen ohne Separation.

f) Die Kulturen ohne Zusätze (nur in RPMI-Medium) zeigten die geringste Proliferationstendenz, zu sehen an dem starken Abfall der reifen Granulozyten ab 5. Tag und dem Auftreten von Nekrozyten schon am 1. und 2. Tag. Die Wachstumsdauer von durchschnittlich 8,75 Tagen war die kürzeste. Bei den Kulturen ohne Ficoll-Separation fand sich ein ausgeprägter Anteil an monopoetischen Zellen.

Die durchschnittlichen Mitose-Indices lagen unter denen der anderen Kulturen. Gleiches gilt für den modifizierten Reifungsindex.

g) Die erreichte Kulturdauer bei Zusatz von PWM-Überstand betrug im Durchschnitt 11,6 Tage bei ebenfalls geringer Proliferationstendenz. Die Zahl der nekrobiotischen und nekrotischen Zellen war am höchsten.

Der mittlere Mitose-Index lag nur am 10. - 12. Tag mit 13,3 %o relativ hoch bei den Ansätzen ohne Ficoll-Separation.

Der modifizierte Reifungsindex blieb bei allen 4 Kultur-reihen niedrig.

Ein positiver Einfluß auf die Lymphopoese war nicht vorhanden, Immunoblasten lagen nur in Ansatz 2 (mit 1,4 % am 11. Tag) über der Ein-Prozent-Grenze, in 33 Stichproben war ihr Anteil unter 0,5 %, und es zeigte sich kein Unterschied nach den definierten Zusätzen.

h) CML-Serum-Zusatz bewirkte die höchste Proliferations- und Ausreifungstendenz bei einer durchschnittlichen Kulturdauer von 11,7 Tagen. Entsprechend zeigten die Ausreifungsindices die höchsten Werte. Für die Zusätze von frischem und gefrorenem CML-Eigenserum ergaben sich bei unterschiedlichen Mitose-Indices fast identische Reifungskurven (Kulturreihe III und IV). Ein Unterschied bestand jedoch in längerer Wachstumsdauer und höheren Mitose-Indices bei Kulturansätzen mit gefrorenem Serum; die Unterschiede der wMI waren jedoch nicht signifikant.

i) Die statistische Auswertung der Mittelwerte aller wMI zeigte an den Tagen 1 - 3 bei allen Zusätzen hochsignifikante Unterschiede zu RPMI-Medium, nach 4 - 6 Tagen waren diese nicht mehr eindeutig zu sichern (1- bis 5-Prozent-Bereich).

j) Der Zusatz von Leukopenie-Serum bewirkte die höchste durchschnittliche Wachstumsdauer von 13,3 Tagen.

Bei allen drei vergleichbaren Kulturen zeigten Leukopenie- und CML-Serum auffallend ähnliche Einwirkungsergebnisse auf die Reifung von Knochenmarkzellen des gleichen Patienten. Am Ende der Kulturdauer war bei Ansätzen mit Leukopenie-Serum ein etwas größerer Anteil von noch teilungsfähigen Zellen vorhanden. Der durchschnittliche weiße Mitose-Index lag in allen Stichproben über dem des CML-Serums. Für Leukopenie- und (gefrorenes) CML-Eigen-Serum ergaben sich bis zum 9. Tag fast identische Werte.

Bei Zusatz von Leukopenie-Serum kam es in allen drei Ansätzen (4, 8, 13) nach 6, 5 bzw. 9 Tagen zu einem Anstieg des wMI, dem in den Reifungskurven von Ansatz 8 und 13 eine relative Zunahme der Teilungsfähigen am 3. und 7. bzw. am 5. und 9. Tag mit Ausbildung einer zweigipfligen Kurve folgte (Abb. 16, 27; S. 35, 43).

4. DISKUSSION

Kulturbedingungen

Die während der Kulturdauer von 10-16 Tagen beobachtete Reifung zu Granulozyten sowie der Nachweis einer ständigen Erneuerung des Reifungs- und des Stammzellspeichers zeigen, daß das gewählte Versuchssystem (Suspensionskulturmethode) geeignet ist, Wachstum und Reifung von Knochenmarkzellen für einige Zeit zu untersuchen.

Bisher gelang es in vergleichbaren Untersuchungen, Knochenmark-Koagulum-Kulturen bis 3 Tage (Boll) oder bis zum 9. Tag (Hütteroth und Litwin; 32) auszuwerten.

Suspensionskulturen mit Zellen aus dem peripheren Blut wurden bei Luyken (39) bis zum 9. Tag und bei Koeppen (34) bis zu 10. Tag ausgewertet. Mit der Agar-Kulturtechnik gezüchtete Kolonie-bildende Einzelzellen konnten noch nach 7 und 14 Tagen morphologisch differenziert werden (Verma, 73; Porter und Ogawa, 61; Moore, 50).

In der Agar-Kultur, einer Halbflüssigkeitskultur, ist nach Metcalf (45), Bradley u.a. die Anwesenheit von höheren Konzentrationen an CSF notwendig, da ohne diese Stimulation praktisch kein Wachstum stattfindet. Knochenmarkzellen in Kultur sollen nur geringe Mengen an CSF selbst produzieren können. Bei Agar-Kulturen werden deshalb dem Nährmedium menschliche weiße Blutzellen zugesetzt, die die früher verwendeten Wuchsstoffe, wie Hühnerembryonaleextrakt u.a., abgelöst haben. Mit der Agar-Kultur-Technik gelingt der Nachweis für das Vorhandensein von undeterminierten und determinierten Stammzellen aus Knochenmark-, Blut-, Milz- oder Leberpräparaten (Mc Culloch, Till, Metcalf, Moore u.a.; 6, 28, 33, 36, 61).

Dagegen werden mit der Suspensionskulturmethode alle Knochenmark- oder Blutzellen gleichzeitig gezüchtet, was den Vorteil hat, daß postulierte Stimulatoren und Hemmfaktoren aus den Zellpopulationen agieren können, und es zu Zell-Zell Interaktionen kommen kann. Nicht zuletzt können durch Zusatz menschlicher Seren von CML, AML, chronischer Monozytenleukämie (CMoL), essentieller Thrombozytopenie (ITP) oder Leukopenie Wirkungen auf die Proliferationsspeicher erzielt werden. Beeinflußung durch Nerven oder innersekretorische Drüsen sind jedoch im Gegensatz zum Tierexperiment ausgeschlossen. Die Befunde sind mit der Methode vielfältiger als mit der Agar-Kultur-Technik: Es können Reifungskurven der Differentialverteilung über die Kulturzeit, Mitose-Indices und karyologische Kurven erstellt und beschrieben werden. Ein Unterschied zu den physiologischen Verhältnissen besteht darin, daß die in der Kultur aus dem Stammzell- über das Proliferationskompartiment entstandenen reifen Zellen in der Suspension bleiben, in Wechselwirkung treten können, und andererseits keine neuen Stammzellen in die Kultur einfließen.

Präsenz von Stimulatoren und Chalonon

Auch ohne Zusatz von Stimulatoren konnten nach Boll (12) in autologem Plasma Proliferationsleistungen erzielt werden, die zu Beginn sogar größer als in vivo waren (gemessen am Mitose-Index).

Letztlich ist aber eine Voraussetzung für das Wachstum einer Knochenmarkkultur das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, die sich entweder noch im Ausgangsmaterial befinden (als "trapped serum" zwischen den nicht gewaschenen Zellen mitinkubiert) und/oder von den in der Kultur entstandenen reifen Granulozyten gebildet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen diese Feststellung. In den Ansätzen mit nur RPMI-Zusatz konnten ein Wachstum und das Vorkommen von Mitosen bis zum 10. Tag ($n = 2$) beobachtet werden. Daneben wurde nach Ficoll-Separation und Waschung eine niedrigere Mitosefrequenz und eine verkürzte Wachstumsperiode beobachtet. Diese "Kontrollansätze" in definiertem RPMI-Medium ohne jeglichen Serumzusatz, die zu 80 % teilungsfähige Zellen und somit nur wenige reife Leukozyten enthielten, zeigten frühzeitig Nekrobiose und Nekrose, gefolgt von generellem Zelluntergang, während die Ansätze aus den Kulturreihen ohne Ficoll-Separation relativ besser proliferierten und sich differenzierten (s. Abb. 1, 10, 19, 30).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Annahme mehrerer Autoren (27,44,45,64), daß die Stimulatoren (CSF) durch vorhandene und entstandene reife Leukozyten oder Monozyten freigesetzt werden, wobei unterschiedliche Meinungen darüber existieren, ob CSF von segmentkernigen Granulozyten und/oder Monozyten und Makrophagen produziert wird (52 u.a.).

Auch die in dieser Arbeit verwendeten Serum-Zusätze enthielten stimulierende Faktoren. Da noch nichts über ihre Wirkungsdauer im verwendeten Kulturmedium bekannt ist, bleibt zunächst unklar, wann das beobachtete Wachstum hauptsächlich von schon vorhandenen, zugesetzten oder erst in der Kultur gebildeten Stimulatoren beeinflusst wurde.

Die gleiche Überlegung gilt grundsätzlich auch für hemmende Faktoren.

Da in der Kontrollkulturen (nur RPMI) die wMI nicht anstiegen, ist die Annahme gestattet, daß in diesen Ansätzen wenig Stimulatoren gebildet wurden.

Nach allen hier verwendeten Zusätzen jedoch konnten im Vergleich zu RPMI für die ersten Kulturtage signifikant höhere mittlere weiße Mitose-Indices errechnet werden (Tab. 6, S. 59).

In den meisten Ansätzen nahm die Granulozytenzahl in der 1. Kulturwoche zu. Der in einigen Ansätzen (2, 5, 7) nach 7 - 8 Tagen zu beobachtende Zellzahlabfall ist als Hinweis auf nicht optimale Kulturbedingungen zu werten. Es bleibt offen, ob neben der Präsenz von Regulationsfaktoren und deren Haltbarkeit im System ausreichend Nährmedium zugesetzt oder toxische Substanzen wirksam wurden.

Proliferation- und Reifungskompartiment in CML-Knochenmarkkulturen

Durch die Untersuchungen von CML-Knochenmarkzellen und CML-Zellkulturen sind Boll (7,13,17), Mangalik (41), Moore (50) und andere zu folgenden Erkenntnissen über die CML gekommen: Der Nachweis der Vermehrung unreifer Zellen deutet auf eine verlängerte Verweildauer aller myeloischen Zellen im Proliferations- und Reifungskompartiment.

Die Lebensdauer der reifen Granulozyten bei CML ist auf das Doppelte verlängert (7,10,13,17).

Der Mitose-Index, der allgemein als Parameter der Regeneration betrachtet wird, ist bei CML in vivo vermindert und zwar von 13 % (normale Knochenmarkzellen) auf 10,9 % (Boll, 13), in einer anderen Übersicht (n = 17) sogar auf 9 % (17).

In der vorliegenden Auswertung (Tab. 5, S. 57) wurde in den Originalansätzen (O d, RPMI) ein durchschnittlicher Mitose-Index von 11,92 % gefunden, der dann im Verlaufe von etwa 10 Tagen auf durchschnittlich 5 % abfiel.

Schöbe (67) beobachtete bei Koagulum-Kultur-Versuchen mit CML-Knochenmarkzellen schon nach 48 h einen Abfall auf ca. 4 %. Nach 6 und 24 Stunden zeigte sich bei ihm ein Anstieg der Mitose-Indices im Vergleich zu den Ausgangskulturen, dieses wurde in unseren Untersuchungen nur in 2 von 16 Stichproben gesehen.

Die Zellzahlvermehrung bei CML-Knochenmarkkulturen ist trotz geringer Mitosen des granulopoetischen Proliferationskompartiments gut zu verstehen, wenn man bedenkt, daß alle leukämischer Zellen der granulopoetischen Reihe eine längere Lebensdauer haben als die normalen. Außerdem ist zu bedenken, daß je mehr teilungsfähige Zellen im Originalansatz vorhanden sind und je mehr teilungsfähige wieder daraus hervorgehen, desto weniger Mitosen notwendig sind, um eine hohe Zellzahlzunahme zu erreichen (Begemann und Hemmerle; 4). Der Mitose-Index als Parameter der Regeneration vernachlässigt die Reifung, was bei der CML dazu führt, daß ein niedriger Mitose-Index trotz starker Zunahme des Stammzell- und des Proliferationskompartiments beobachtet wird, weil die Reifung stark verzögert ist.

Entsprechend zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung ein steigender Anteil der Teilungsfähigen bis zu einer Kulturdauer von 2 Tagen bei drei der vier Kulturreihen, was mit den Ergebnissen von Schöbe (67) übereinstimmt. Boll und Mersch (14) beschrieben schon 1969 diese über 48 Stunden Kulturdauer anhaltende Vermehrung teilungsfähiger Zellen. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse bei chronischer Monozytenleukämie (CMoL). In zwei Kontrollkulturen von CMoL-Knochenmark mit Zusatz von autologem Serum (40 %) wurde eine Zunahme Teilungsfähiger anhand der Reifungskurven erst nach 3 Tagen beobachtet (54).

Vergleich der definierten Zusätze

PWM-Überstand

PWM, hauptsächlich bekannt als Lymphozytenstimulator (B-Zell-Stimulator), soll nach Cline (19) auch eine Freisetzung von Stimulatoren aus Granulozyten und Monozyten bewirken. PWM-Überstand aus der 5-Tage-Leukozytenkultur eines Gesunden zeigte in den vorliegenden Untersuchungen weder auf die Lymphopoese noch auf die

Granulopoese einen starken Einfluß, wobei auch hier - wie bei den Ansätzen mit reinem Nährmedium - eine Vermehrung der monopoetischen Zellen gesehen wurde. Nach Angaben verschiedener Autoren soll die Monopoese durch niedrige und die Granulopoese durch hohe CSF-Konzentrationen stimuliert werden (46,52,59).

Die in den Kulturansätzen mit Zusatz von PWM-ÜST am 1. - 3. und am 10. - 12. Tag zu erkennende bessere Proliferationstendenz (Tab. 6, S. 59) der Granulopoese - im Gegensatz zu den reinen RPMI-Ansätzen - könnte mit den Überlegungen von Astaldi (1) erklärt werden, der eine ganz unspezifische Wirkung von PWM durch Verletzung von Granulozyten und damit eine kurzfristige Freisetzung von Hämatopoesestimulatoren für möglich hält.

Der höhere mittlere Mitose-Index im Vergleich zum RPMI-Medium am 10. - 12. Tag (schwach signifikant) ist allerdings beachtenswert (Tab. 6, S. 59; Abb. 37, S. 58). Schnurrbusch (66), der die Wirkung von autologem Serum auf normale menschliche Knochenmarkzellen untersuchte, fand ebenfalls einen zweiten Wachstumsschub sowohl in der Erythro- als auch in der Granulopoese. Für die Erythropoese erklärte er das mit einer möglichen Stimulation von Vorläuferzellen, die 5 bis 8 Tage zur Umwandlung in Erythroblasten benötigen sollen. Ob Ähnliches auch für die Granulopoese angenommen werden kann, bleibt offen.

Der Vergleich von PWM-Überstand mit anderen Serumzusätzen wird hier erstmals durchgeführt. PWM-Überstand von Leukozytenkulturen eines Gesunden soll wie Normalserum eine höhere Stimulation von CML-Knochenmarkzellen als CML-Serum erzielen; nach den hier vorliegenden Ergebnissen trifft dieses für PWM-Überstand nur bedingt zu (Tab. 6, S. 59).

CML-Serum-Zusatz

Über die Auswirkungen von CML-Serumzusätzen auf Knochenmarkkulturen liegen schon mehrere Untersuchungen vor, wobei besonders "Nicht-CML-Knochenmark" geprüft wurde (Boll, Skoblo, Lübke, Emberger u.a.).

Die Annahme, daß CML-Serum nicht nur die Regeneration im Stammzellspeicher vermehrt, sondern auch die gesamte Proliferation der Granulopoese, also die Reifung in vitro hochsignifikant anregt, konnte hier für CML-Knochenmarkzellen bestätigt werden (Abb. der GZ/GBI-Indices: S. 62 u. 63).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstum von CML-Knochenmarkkulturen nach CML-Serumzusatz (autolog, heterolog, frisch und gefroren) untersucht. Ein unterschiedlicher Effekt von frischem oder gefrorenem CML-Eigenserum auf die Regeneration des untersuchten Knochenmarks konnte festgestellt werden. Die Mitose-Indices lagen nach Zusatz von gefrorenem Serum bei fast jeder Stichprobenentnahme über denen mit frischem Eigenserum, wenn auch nur am 2. Tag der Kulturreihe IV eine Signifikanz errechnet werden konnte (Tab. 4, S. 56). Durch die zusammenfassende Auswertung der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen war ein Hinweis auf einen nicht gefrierstabilen Inhibitor zu erhalten (17).

Der unterschiedliche Zusatz von autologem und heterologem CML-Serum zeigte keine verschiedenartige Wirkung auf die Ausreifungstendenz.

In allen vier Kulturreihen war einheitlich nach 4 - 5 Tagen eine im Gegensatz zu RPMI-Zusatz verbesserte Ausreifung mit Anstieg der Reifungs-Indices zu beobachten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Skoblo, Lübke und Emberger, die bei vergleichbaren Ansätzen am Ende der Koagulumkultur (nach 2 - 3 Tagen) einen Beginn der Ausreifung beobachteten.

In Voruntersuchungen wurde beschrieben, daß CML-Serum auf CML-Knochenmark weniger stimulatativ wirkt als normales Serum (Boll und Mitarbeiter; 17). Während normales Serum in CML-Knochenmarkkulturen nach 1 - 2 Tagen zu einem Anstieg des weißen Mitose-Indexes führte, kam es bei Inkubation mit autologem CML-Serum zu einer Erniedrigung der Mitoseaktivität. Andererseits wird sowohl die Regeneration als auch die Differenzierung von normalen Knochenmarkszellen durch CML-Serum stärker angeregt als durch autologes Normalserum (Boll; 17). Ein Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist nicht möglich, da Normalserum nicht verwendet wurde.

Zusatz von Leukopenie-Serum

Es ist nachgewiesen, daß der Zusatz von Leukopenie-Serum eine erhöhte Regeneration der normalen granulopoetischen Zellen bewirkt (38). Während bei CML-Zellen der Mitose-Index in vivo auf 70 % des Normalwertes erniedrigt ist, ist die Mitoseaktivität des Knochenmarks von Patienten mit Neutropenie um 20 % erhöht (Boll; 17). In vitro stellten Lüllwitz-Hoch und Boll (38) einen eindeutig höheren Mitose-Index nach 2 Tagen im Vergleich zum autologen Medium bei Einwirkung von 40 %-igem Leukopenie-Serum auf normales Knochenmark fest. Von derselben Patientin mit cyclischer Neutropenie stammt das in der vorliegenden Arbeit verwendete Leukopenie-Serum. Bemerkenswert ist, daß die CML-Granulopoese durch Leukopenie-Serum ähnlich stark wie durch gefrorenes CML-Serum stimuliert wurde (s. Abbildungen 17,28,8 S. 35,44,28 im Vergleich zu Abb. 15,26,35 S. 34,42,51). Nicht nur bei CML-Serum, sondern auch bei Leukopenieserum, das ja auch eingefroren war, erhebt sich die Frage, ob das Einfrieren einen Einfluß auf die Wirkung hatte. Im Serum einer Patientin mit cyclischer Neutropenie fanden Moore, Metcalf u.a. (52,46) die höchsten CSF-Konzen-

trationen bei hohem Monozytenanteil und geringster Neutrophilenzahl. Sie schlossen daraus, daß hohe CSF-Konzentrationen zur Granulozyten- und niedrige zur Monozytenproduktion führen. Ein relativer Abfall von stimulierender Aktivität nach 4 bis 6 Tagen könnte hier die Zunahme der Monopoese erklären, die bei fast allen Kulturansätzen mit Leukopenie-Serum-Zusatz beobachtet wurde (Abb. 8,17,28). In den Ansätzen, denen CML-Serum zugesetzt wurde, fehlt dieser Abfall an stimulierender Aktivität (Abb. 6,15,24,26 u. 33, s.S. 26,34,41,42,49). Die geringe Monopoese in den Kulturen nach Ficoll-Separation ist damit zu erklären, daß die Monozyten beim Zentrifugieren zwischen den Waschungen an den Glaswänden haften blieben.

Wir stellen hier also erstmalig fest, daß die stimulierende Aktivität von Leukopenie-Serum auch auf CML-Knochenmarkzellen wirkt.

FICOLL-Separation

Mehrere Untersucher (31,56) konnten aus normalem Knochenmark durch Dichte-Separation Zellen geringerer Dichte isolieren, die auch ohne CSF-Zusatz zur zahlreichen Koloniebildung auf Agar-Kulturen fähig waren. Diese leichtere Zellgruppe setzte sich zu 80 - 90 % aus noch Teilungsfähigen zusammen. Wurde diesen Kulturen bestimmte Mengen von Zellen höherer Dichte (also fast ausschließlich Segmentkernige) zugesetzt, so kam es zu einer Hemmung der Koloniebildung. In normalem Knochenmark können also durch Dichte-Separation hemmend wirkende Zellen ausgesondert werden. Wären diese Erkenntnisse ohne weiteres auf CML zu übertragen, so müßte man in CML-Knochenmarkkulturen nach Ficoll-Separation eine viel höhere Proliferationsaktivität als ohne erwarten. Das war in der hier vor-

liegenden Untersuchung nicht der Fall. So erscheint es möglich, daß unter der noch zu diskutierenden Annahme einer verminderten Wirkung von Chalon bei CML ohne und nach Ficoll-Separation ein gleichartiges Wachstum stattfindet. Die hier beobachtete verminderte Regeneration und Differenzierung von CML-Knochenmarkzellen nach Ficoll-Separation kann mit einer Stimulatorenreduktion durch Waschen und Haftenbleiben am Zentrifugenglas erklärt werden.

Chalon-Reduktion (Diskussion einer Hypothese)

Untersuchungen von Knochenmarkkulturen nach Zusatz von verschiedenen Seren erbrachten unter anderem folgende Erkenntnisse (17):

- CML-Knochenmark wird durch normales menschliches Serum stärker stimuliert als durch CML-Serum.
- Normales Knochenmark wird durch CML-Serum stärker stimuliert als durch normales Serum.

Boll (17) erklärt das mit dem Vorhandensein eines gefrierinstabilen Chalons im CML-Serum. In ihren Untersuchungen war u.a. normalen Knochenmarkzellen gefrorenes CML-Serum zugesetzt worden, während CML-Knochenmarkzellen nach Zusatz von frischem autologen Serum untersucht wurden. Ein Vergleich der Einwirkungen von frischem und gefrorenem CML-Eigenserum auf CML-Knochenmarkzellen erbrachte in der vorliegenden Arbeit eine stärkere Regeneration bei gefrorenem Eigenserum (Tab. 3, S.55; Tab. 4, S. 56).

Eine andere mögliche Erklärung ließe sich durch ein u.a. auf Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung basierendes Konzept finden:

CML-Serum könnte eine ausreichend hemmende Wirkung auf Regeneration und Proliferation von Knochenmarkzellen fehlen.

Da man weiß, daß im CML-Knochenmark viele genetisch

veränderte reifungsgestörte Zellen wachsen (s. Einleitung S. 5), gleichzeitig die noch vorhandenen normalen, also relativ schnell ausreifenden Zellen unterdrückt sind, kann man sich vorstellen, daß diese gestörten Granulozyten selbst bei überfülltem Reifungsspeicher im Gegensatz zu normalen zu wenig oder ein weniger wirksames Chalon produzieren, wobei die Ansprechbarkeit auf hemmende Faktoren erhalten bleibt.

Wird CML-Knochenmarkkulturen CML-Serum zugesetzt, das ja hauptsächlich stimulierende Aktivität enthalten soll (26, 65), so wird diese Aktivität zum großen Teil von pathologischen, d.h. langsam ausreifenden Zellen verbraucht. Es wird deshalb eine relativ mäßige Stimulation beobachtet. Normales Serum, das außer stimulierender Aktivität auch wirksames Chalon enthält, erreicht paradoxerweise einen höheren Effekt, da es zu einer Wachstumseinschränkung pathologischer Zellen (Chaloneffekt) und zu Stimulatorenbereitstellung für besser ausreifende Zellen kommt. Schöbe (67) stellte bei seinen Untersuchungen über die Wirkung eines tierischen Granulozytenchalons keinen suppressiven Effekt auf menschliche CML-Knochenmarkzellen fest. Eine bessere Ausreifungstendenz nach Chalonzusatz fand er allerdings nicht, was nach den oben beschriebenen Vorstellungen denkbar wäre.

Ein weiterer Hinweis auf die Verminderung von hemmenden Zellen oder Faktoren bei CML ergibt sich dadurch, daß die an sich zu erwartende bessere Ausreifung nach Ficoll-Separation wegen der Abtrennung von normalerweise hemmend wirkenden Zellen hier nicht beobachtet wurde.

Craddock (20) postulierte schon 1962 das Fehlen von Inhibitoren im Serum von Patienten mit CML.

Metcalf untersuchte u.a. die Konzentration von inhibierenden Substanzen im Serum und Urin und fand eine Reduktion bei 57 % der Patienten mit myelomonozytären und akuten Myeloblastenleukämien. Bei beginnender CML zeigte sich

nur ein erhöhter CSF-Spiegel, während ein Abfall der Inhibitoren erst bei der finalen Blastenkrise die Ausmaße bei akuter Leukämie erreichte.

Rytömaa (65) vermutet eine verminderte Chalon-Produktion der leukämischen Zellen.

Frassoni (26) wies 1981 in einer Versuchsreihe (mit Agar-Kultur-Technik) eine verminderte oder fehlende Hemmwirkung von mitogenstimulierten CML-Leukozyten auf menschliche Knochenmarkzellen nach:

CML-Knochenmarkzellen zeigten in Kulturen mit Zusatz von mitogenstimulierten autologen T-Lymphozyten uneingeschränktes Wachstum (100 %); der gleiche Zusatz bewirkte auch bei normalen Knochenmarkzellen gleich gute Proliferationsleistungen. CML-Knochenmark mit Zusatz von stimulierten heterologen T-Lymphozyten eines Gesunden bzw. eines Patienten mit aplastischer Anämie zeigte dagegen eine 50%-ige Reduktion der Koloniebildung. In einer Voruntersuchung von Bacigalupo (3) war festgestellt worden, daß normales Knochenmark ebenfalls gehemmt wurde: nach Zusatz von heterologen stimulierten T-Lymphozyten eines Gesunden kam es zu 74 %-iger Reduktion des Wachstums, während Zellen einer aplastischen Anämie sogar eine 84 %-ige Reduktion hervorriefen. Mediator dieser Suppression soll ein löslicher Faktor (Glykoprotein) sein, der im Überstand von PWM-stimulierten T-Lymphozytenkulturen vorhanden sein soll (60). Bei chronisch-myeloischer Leukämie soll dieser Faktor nicht (ausreichend) gebildet werden, die CML-Knochenmarkzellen sollen ihre Ansprechbarkeit auf das Chalon jedoch behalten.

Der bei CML in vivo und in vitro zu beobachtende niedrige Mitoseindex stellt nur scheinbar einen Widerspruch zu der oben beschriebenen Hypothese eines Chalonmangels bei CML dar. Der Mitoseindex ist nicht unbedingt

mit der Mitosehäufigkeit gleichzusetzen (9: S. 223-224). Bei einer Reifungsstörung mit erhöhter Anzahl noch teilungsfähiger Zellen kann die Mitosehäufigkeit größer sein, als durch den Mitoseindex veranschaulicht wird (s. auch S. 71).

Der Versuch, die Wirkung von verschiedenen Seren auf CML-Knochenmarkzellen unter dem Aspekt der noch ungeklärten Pathogenese dieser Erkrankung zu deuten, bleibt unbefriedigend.

Untersuchungen von Knochenmarkzellen desselben Patienten innerhalb bestimmter Zeitintervalle mit der Suspensionskulturmethode und nach verschiedenen Zusätzen können vielleicht zur Verdeutlichung der Krankheitsentwicklung beitragen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Unter Anwendung der Suspensionskulturmethode wurde das Wachstum von Knochenmarkzellen von vier Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie nach Zusatz von verschiedenen Testsubstanzen und Seren über einen Zeitraum von 16 Tagen untersucht. Bei diesen Zusätzen handelte es sich um Pokeweed-Mitogen-Überstand, CML-Seren (autolog, heterolog, frisch und gefroren) und Leukopenie-Serum. Als Kontrolle dienten Kulturen mit definiertem Nährmedium (RPMI). Das Knochenmark von zwei Patienten wurde vor der Anzüchtung nach FICOLL separiert.

Reifungskurven, Differentialverteilungskurven, Mitose- und Ausreifungsindices dienten zur Darstellung von Regeneration und Reifung der Zellen.

Leukopenie- und gefrorenes CML-Serum hatten einen ähnlich stark stimulierenden Effekt. Während sich nach Zugabe von frischem und gefrorenem CML-Serum fast identische Reifungskurven zeigten, wurde die Regeneration durch gefrorenes Serum stärker angeregt als durch frisches. Pokeweed-Mitogen-Überstand hatte auf die Regeneration einen von RPMI-Medium abweichenden Einfluß, während die Reifung keine wesentlichen Unterschiede aufwies.

Nach Ficoll-Separation war die Proliferationsaktivität nicht verstärkt.

Zum Schluß wurde eine Hypothese diskutiert, die das Wachstumsverhalten von CML-Knochenmarkkulturen unter der Annahme einer Reduktion von Chalon zu erklären versucht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Astaldi, G., Sauli, S., Airo, R., Ratto u.a.:
Effect of Phytohemagglutinin on lymphocytes from
different leukemias
Texas Reports on Biology and Medicine, 23: 569 (1965)
2. Baccarani, M., Killmann, S.A.:
Cytokinetic Studies in Chronic Myeloid Leukemia:
Evidence for Early Presence of Abnormal Myeloblasts
Scand. J. Haemat., 9: 283 (1972)
3. Bacigalupo, A. et al.:
Immune Suppression of Hematopoiesis in Aplastic
Anemia - Activity of T- γ -Lymphocytes
J. of Immunol. 125: 1449 (1980)
4. Begemann, H., Hemmerle, W.:
Die Mitoseaktivität des menschlichen Knochenmarks und
ihre Beeinflussung durch zytostatische Substanzen
Klin. Wschr. 27: 530 (1949)
5. v. Beust, Albrecht:
Wirkung von Serum einer beginnenden myeloischen Leukämie
auf die Proliferation menschlichen Knochenmarks in vitro
Dissertation Berlin (1975)
6. Blackburn, M., Patt, H.:
Influence of a marrow stromal factor on survival of
hemopoietic stem cells in vitro
Exp. Hemat. 8: 77 (1980)
7. Boll, I.:
Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen
Granulopoese
Fol. haemat. (Leipzig) 91: 172 (1969)
8. Boll, I.:
Kinetik leukämischer Elastin
aus: Leukämie Herausgeber: Gross, v.d. Loo
Springer-Verlag Berlin Heidelberg S. 161 (1972)

9. Boll, I.:
Granulozytopoese-Morphologie, Physiologie, Kinetik
und Funktion; aus Handbuch der Inneren Medizin
Band II/3 Leukozytäres System I; Springer-Verlag
Berlin Heidelberg New York S. 212 (1976)
10. Boll, I.:
Das granulozytäre Zellsystem
Das Knochenmark, Herausgeber: W. Queißer, Georg-
Thieme Verlag Stuttgart S. 184 (1978)
11. Boll, I.:
Die erworbenen Granulozytopenien
Das Knochenmark, Herausgeber: W. Queißer, Georg-
Thieme Verlag Stuttgart S. 512 (1978)
12. Boll, I.:
Knochenmarkkulturen
Das Knochenmark, Herausgeber: W. Queißer Georg-
Thieme Verlag Stuttgart S. 42 (1978)
13. Boll, I.:
Zytologische Knochenmarkdiagnostik
Zweite, neubearbeitete Auflage; Springer Verlag
Berlin, Heidelberg, New York S. 21 (1980)
14. Boll, I., Mersch, G.:
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik
der normalen und pathologischen Granulozytopoese in
vitro
Blut 19: 257 (1969)
15. Boll, I., Collmann, H., Aust, Ch.:
Quantitative Bestimmung der Proliferationskinetik des
menschlichen Knochenmarks während drei Kulturtagen
Blut 31: 201 (1975)
16. Boll, I., Koeppen, K.-M.:
Die hereditären und konstitutionellen Granulozytopenien
Das Knochenmark, Herausgeber: W. Queißer, Georg-Thieme
Verlag Stuttgart S. 506 (1978)
17. Boll, I.T.M. and coworkers:
Serum Factors influencing Human Granulocytopoietic
Proliferation in Clot Cultures
Experimental Hematology 7: 121 (1979)

18. Claus, G., Ebner, H.:
Grundlagen der Statistik
Verlag Harri Deutsch Frankfurt/Main S. 227 (1971)
19. Cline, M.J., Golde, D.W.:
Production of Colony-Stimulating Activity by Human
Lymphocytes
Nature 248: 703 (1974)
20. Craddock, C.G., Rodensky, D., Forsen, N.R., Como, R.M.:
Myeloblastic leukemia (AML) showing maturation in
vivo and suppression of normal hemopoiesis the
effect of antithymocyte globulin
Blood 48: 985 (1976)
21. Dale, D.C., Alling, D.W., Welff, S.M.:
Cyclic Hematopoiesis: the mechanism of cyclic neutro-
penia in grey collie dogs
J. Clin. Invest. 51: 2197 (1972)
22. Drings, P.:
Die chronische myeloische Leukämie
Das Knochenmark, Herausgeber: W. Queißer, Georg-Thieme
Verlag Stuttgart S. 297 (1978)
23. Douglas, S.D., Fudenberg, H.H.:
In vitro development of plasma cells from lymphocytes
following pokeweed mitogen stimulation: a fine
structural study
Exp. Cell. Res. 54: 227 (1969)
24. Emberger, Peter:
Die Proliferation menschlicher Knochenmarkszellen bei
Chronisch-Myeloischer Leukämie unter Einwirkung von
Plasma und Serum nicht leukämischer Probanden im Ver-
gleich mit der Kultivierung im autologen Medium
Dissertation Berlin S. 50 (1977)
25. Francis, G.D., Rhode, E.:
Bone Marrow Endogenous Colony Stimulating Factor(s):
Relation to Granulopoiesis in Vivo
Exp. Hemat. 9: 332 (1981)

26. Frassoni, F., Podesta, M., Marmont, A.M., Piaggio, G.,
Bacigalupo, A.:
Suppression of CFU-C Growth in Chronic Granulocytic
Leukämia: Activity of Autologous, Normal and
Aplastic Anemia T-Cells
Exp. Hemat. (sup.) 9: 316 (1981)
27. Golde, D., Rothman, B., Cline, M.:
Production of Colony-Stimulating Factor by Malignant
Leukocytes
Blood 43: 754 (1974)
28. Gordon, M., Courtenay, V., Blackett, N.:
A simple method for quantitating endogenous CSA
Exp. Hemat. 8: 147 (1980)
29. Guerry, D., Dale, D.C., Omine, S., Wolff, S.M.:
Periodic hematopoiesis in human cyclic neutropenia
J. Clin. Invest. 52: 3220 (1973)
30. Hagenbeek, A., Martens, A.:
Separation of Normal Hemopoietic Stem Cells from
Clonogenic Leukemic Cells in a Rat Model for Human
Acute Myelocytic Leukemia. Velocity Sedimentation in
Combination with Density Gradient Separation
Exp. Hemat. 9: 573 (1981)
31. Haskill, J.S., Mc Knight, R.D., Galbraith, P.R.:
Cell-Cell Interaction in Vitro: Studies by Density
Separation of Colony-Forming, Stimulating, and
Inhibiting Cells from Human Bone Marrow
Blood 40: 394 (1972)
32. Hütteroth, T.H., Litwin, S.D.:
Differentiation of human lymphocytes by Pokeweed-
Mitogen in vitro: Studies in normal and in immuno-
deficient subjects
Klin. Wschr. 55: 743 (1977)
33. Johnson, G.R., Metcalf, D.:
Multipotential Colony Formation in Agar Cultures
Stimulated by Spleen-Conditioned Medium
Exp. Hematology Today; Edit. Baum, Ledney, Bekkim
Verlag S. Karger Basel München S. 29 (1980)

34. Koeppen, K.M., Boll, I.:
Die Prognose der akuten myeloischen Leukämie der
Erwachsenen aus der Zellkultur
DBÄ (Die Berliner Ärztekammer) 6: 356 (1979)
35. Krüger, G., Fischer, R.:
Das maligne Non-Hodgkin-Lymphom
Der Internist Springer Verlag Berlin 21: 483 (1980)
36. Lau, L., McCulloch, E.A., Till, J.E., Price, G.B.:
The Production of Hemopoietic Growth Factors by
PHA-Stimulated Leukocytes
Exp. Hemat. 6: 114 (1978)
37. Lübke, Rolf:
Wirkung von Seren von Patienten mit chronisch-
myeloischer Leukämie auf die Proliferation mensch-
lichen Knochenmarks in vitro
Dissertation Berlin (1975)
38. Lüllwitz-Hoch, Renate:
Die Einwirkung von Seren bei Agranulozytose auf
menschliches Knochenmark in vitro
Dissertation Berlin (1975)
39. Luyken, Hans-Thomas:
Morphologische Untersuchungen an Leukozyten von Plasmö-
zytom-Patienten in vitro unter Stimulation mit
Phytohämagglutinin und Pokeweed-Mitogen
Dissertation Berlin (1978)
40. Mac Nalty, Sir Arthur:
The British Medical Dictionary
Coxton Publishing Company Limited London (1975)
41. Mangalik, A., Robinson, W.A.:
Cyclic Neutropenia: The Relationship between Urine
Granulocyte Colony Stimulating Activity and
Neutrophil Count
Blood 41: 79 (1973)
42. McCoulough, C., v. Atta, L.:
Statistical Concepts
Mc Graw-Hill Inc., New York (1970)

43. Mendes, N.F., Zehna, M.H.:
Lymphocyte membrane receptors in cultures treated
with mitogens
Cell. Immunol. 12: 331 (1974)
44. Metcalf, D.:
The Colony Stimulating Factor (CSF)
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 50: 547 (1972)
45. Metcalf, D.:
Regulation of Granulocyte and Monocyte-Macrophage
Proliferation by Colony Stimulating Factor (CSF):
A Review
Exp. Hemat. 1: 185 (1973)
46. Metcalf, D., Burgess, A.W., Johnson, G.R.:
Stimulation of Multipotential and Erythroid Precursor
Cells by GM-CSF
Experimental Hematology Today, Edit. Baum, Leney,
Bekkim Verlag S. Karger Basel München S. 3 (1980)
47. Meuret, G., Flidner, T.M.:
Neutrophil and monocyte kinetics in a case of cyclic
neutropenia
Blood 43: 565 (1974)
48. Meuret, G.:
Das monozytäre Zellsystem
Das Knochenmark, Herausgeber: W. Queißer, Georg-Thieme
Verlag Stuttgart S. 201 (1978)
49. Moberg, C., Olofsson, T., Olsson, K.:
Granulopoiesis in Chronic Myeloid Leukaemia
Scand. J. Haemat. 12: 381 (1974)
50. Moore, Malcolm:
In vitro culture studies in chronic granulocytic
leukaemia
Clinics in Haematology 6: 97 (1977)
51. Moore, M.A.S., Williams, N., Metcalf, D.:
In vitro Colony Formation by normal and leucemic human
hemopoietic cells. Characterisation of Colony Forming
Cells
Journal of the Nat. Cancer Inst. 50: 603 (1973)

52. Moore, M.A.S., Spitzer, G., Metcalf, D., Penington, R.:
Monocyte production of colony stimulating factor in
familial cyclic neutropenia
Journal of Haematology 27: 47 (1974)
53. Morley, A.A., Baikie, A.G., Galton, D.:
Cyclic Leukocytosis as Evidence for Retention of
Normal Homoeostatic Control in Chronic Granulocytic
Leukaemia
The Lancet 23: 1320 (1967)
54. Niederdräing, Mercedes-Christine:
Die Wirkung von Serum eines Patienten mit chronischer
Monozytenleukämie auf die Proliferation des mensch-
lichen Knochenmarks in vitro
Dissertation Berlin (1979)
55. Ogawa, M., Fried, J., Sakai, Y., Strife, A.,
Clarkson, B.D.:
Studies of Cellular Proliferation in Human Leukemia.
VI. The Proliferation Activity, Generation Time, and
Emergence Time of Neutrophilic Granulocytes in
Chronic Granulocytic Leukemia
Cancer 25: 1031 (1970)
56. Olofsson, T., Olsson, I.:
Granulopoiesis in Chronic Myeloid Leukemia. Serial
cloning of blood and bone marrow cells in Agar Culture
Blood, 48: 351 (1976)
57. Paukovits, W.R.:
Control of granulocyte production: Separation and
chemical identification of a specific inhibitor
(chalon)
Cell Tissue Kinet. 4: 539 (1971)
58. Paukovits, W.R.:
Spezifität und Wirkungsmechanismus des Granulozyten-
chalons und seine Rolle im Regulationssystem der
Granulopoese
Österreichische Zeitschrift für Onkologie 2: 51 (1975)

59. Pedersen, Bent:
Pathogenesis and blastic transformation of chronic
myeloid leukemia as consequences of Ph¹-positive
stem cell hyperplasia: a unifying concept
Blood Cells 3: 535 (1977)
60. Podesta, M., Frassoni, F., Van Lint, M.T., Marmont, A.,
Bacigalupo, A.:
Mitogen Induced Generation of CFU-C Suppressor T Cells:
Effect of PHA, PWM and CON A
Exp. Hemat. 9: 25 (1981)
61. Porter, P., Ogawa, M., Leary, A.:
Enhancement of the growth of human early erythroid
progenitors by bone marrow conditioned media
Exp. Hemat. 8: 83 (1980)
62. Queißer, Wolfgang:
Das Knochenmark; Morphologie, Funktion, Diagnostik
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1978)
63. Rickard, K., Morley, A., Howard, D., Stohlman, F.:
The In Vitro Colony-Forming Cell and the Response
to Neutropenia
Blood 37: 6 (1971)
64. Robinson, W.A., Mangalik, A.:
Regulation of Granulopoiesis: Positive Feed-Back
Lancet 7: 742 (1972)
65. Rytömaa, T., Kiviniemi, K.:
Control of Cell Production. Chalon and Antichalon,
two specific humoral regulators
Cell tiss. Kinet., 1: 329 (1968)
66. Schnurrbusch, Erhard:
Die Wirkung von autologem Serum mit unterschiedlichen
Konzentrationen auf das normale menschliche Knochen-
mark in Langzeitkulturen
Dissertation Berlin (1982)

67. Schöbe, Siegfried:

Die Einwirkung eines Granulozytenchalonextraktes auf
menschliches Knochenmark in vitro von Patienten mit
chronisch-myeloischer Leukämie
Dissertation Berlin (1979)

68. Schubert, J.:

Nachweisverfahren und Separationsmöglichkeiten mensch-
licher hämopoetischer Stammzellen
Das Knochenmark, Herausgeber: W. Queißer Georg Thieme
Verlag Stuttgart S. 36 (1978)

69. Skoblo, Michael-Roman:

Die Beeinflussung der Proliferation von menschlichen
Knochenmarkzellen durch Serum von Patienten mit chro-
nisch-myeloischer Leukämie vor und nach Hitzebehandlung
Dissertation Berlin (1980)

70. Sterry, Klaus:

Die Wirkung von Granulozyten-Chalon auf proliferations-
kinetische Parameter von menschlichen Knochenmarkkulturen
Dissertation Berlin (1978)

71. Stryckmans, P., Debusscher, L., Socquet, M.:

Regulation of bone marrow myeloblast proliferation
in chronic myeloid leukemia
Cancer Research 36: 3033 (1976)

72. Undritz, Erik:

Atlas of Haematology (Sandoz)
Second revised and enlarged edition; Sandoz (1973)

73. Verma, D., Spitzer, G., Zander, A., Fisher, R.,
Mc Credie:

The myeloid progenitor cell: a parallel study of sub-
populations in human marrow and peripheral blood
Exp. Hemat. 8: 32 (1980)

74. Wollert, Klaus:

Die Einwirkung von Granulozytenchalon auf Knochenmark-
Suspensionskulturen regenerierender toxischer Agranulo-
zytosen
Dissertation Berlin (1979)

Frau Professor Dr. med. Irene Boll möchte
ich danken für die Überlassung des Themas;
durch ihre wertvollen Ratschläge, Kritik und
Ermunterung konnte diese Arbeit fertiggestellt
werden.

Mein weiterer Dank gilt Dr. med. Klaus-M. Koeppen,
Oberarzt der II. Inneren Abteilung des Kranken-
hauses Neukölln, für seine oft neue Impulse
vermittelnde freundliche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 12. Mai 1945 wurde ich in Bayreuth geboren.
Meine Eltern sind Friedrich Möllmann und
Lydia Möllmann, geborene Schulte.

Meine Einschulung erfolgte 1951 in die Gemein-
schaftsschule in Heeren-Werve/Kreis Unna in
Nordrhein-Westfalen.

1956 wechselte ich zum Städtischen Gymnasium
Kamen. Im gleichen Jahr zog unsere Familie nach
Münster. An der Wichern-Realschule erreichte
ich die Mittlere Reife 1963; nach Besuch der
Höheren Handelsschule Münster wechselte ich
zum Wirtschaftsgymnasium in Osnabrück. Das
Zeugnis der Reife erhielt ich am 2. Juni 1967.
Im Anschluß an meine Wehrpflichtzeit begann ich
im April 1969 mit dem Studium der Humanmedizin
an der Freien Universität Berlin. Im September
1975 bestand ich die Ärztliche Prüfung.

Nach der Medizinal-Assistenten-Zeit erhielt ich
die Approbation als Arzt am 12. Mai 1977.
Im Februar 1978 begann ich meine Ausbildung zum
Facharzt für Innere Medizin in der Abteilung
für Geriatrie des Krankenhauses Berlin-Neukölln.

